

ANDERSON JOCEMAR MOURA

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTA DE
AMBIENTES IMPACTADOS E NÃO IMPACTADOS PELA DRENAGEM
ÁCIDA DE MINA DE CARVÃO (DAM)

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia e Biociências
da Universidade Federal de
Santa Catarina, para obtenção
do Grau de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Dr. Leonardo Rubi
Röriq

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moura, Anderson Jocemar

MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTA DE
AMBIENTES IMPACTADOS E NÃO IMPACTADOS PELA DRENAGEM ÁCIDA
DE MINA DE CARVÃO (DAM / Anderson Jocemar Moura ;
orientador, Leonardo Rubi Rôrig - Florianópolis, SC, 2014.
121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Drenagem ácida de
minas. 3. Bactérias endofíticas. 4. Fitorremediação. 5.
Metais Pesados. I. Rôrig, Leonardo Rubi . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO DA SECRETARIA

Dedico esse trabalho aos grandes amores da minha vida:

Deus,
meus pais, Jocemar e Elisabeth,
minha esposa Fernanda
e meu filho Lucas.

Quanto mais um homem se aproxima de suas metas,
tanto mais crescem as dificuldades.

Johann Wolfgang von Goethe

Agradecimentos

À Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Ao meu orientador Dr. Leonardo R. Rörig, pela confiança, incentivo, ensinamentos, compreensão e amizade que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Obrigado por tudo.

Aos Professores Marcus Adonais Castro da Silva e André Oliveira de Souza pelos ensinamentos, conversas, convívio e pelo apoio a minha formação, inclusive pessoal. É um prazer tê-los na banca.

Ao professor Rafael Trevisan pela identificação das espécies vegetais e pela colaboração no projeto.

Ao Programa de Biotecnologia e Biociências da UFSC pela infraestrutura oferecida, equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade do Vale do Itajaí, em especial, aos Laboratórios de Ficologia (LAFICμ - UFSC), Microbiologia Aplicada (LAMA - UNIVALI) e Genética Molecular (LGM - UNIVALI) pela infraestrutura e suporte oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, em especial ao Pablo (galo) pelo incentivo, conversas e apoio constantes.

Ao Laboratório de Solos e a Lidiane Pires Gouvêa pelo apoio nas análises de nutrientes.

Aos funcionários e amigos do LAMA e LGM pela agradável convivência, pelo apoio e pela amizade cultivada: Cesar Augusto Stramosk, Thiago Meinicke de Melo e Tiago Tolentino.

À minha esposa Fernanda, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais vivo de verdade. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre.

Ao meu filho Lucas, meu bem maior, mesmo não compreendendo tudo isso, iluminou de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos.

E finalmente, porém não menos importante, agradeço muito a minha família. Quero agradecer de forma grata e grandiosa meus pais Jocemar e Elisabeth pelo carinho e compreensão incondicionais, mesmo nos momentos mais críticos. As minhas irmãs Alessandra e Silvana pelo apoio e amor incondicional. Aos meus sobrinhos Guga, Duda e Gui, por estarem sempre ao meu lado e entenderem minhas ausências. Ao meu cunhado Leonardo pelo incentivo e pela força.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Resumo

A Drenagem Ácida de Mina de Carvão (DAM) é o impacto mais significativo na região carbonífera do Estado de Santa Catarina, tendo a oxidação da pirita (FeS_2) como o principal responsável por desencadear tal impacto. A água derivada da mineração, do processamento e dos rejeitos apresentam pH baixo (<3) e elevados níveis de metais pesados, afetando severamente as bacias hidrográficas e o solo. Os métodos convencionais estabelecidos para remediar esse ambiente contaminado são frequentemente caros, invasivos e não fazem uso eficaz dos recursos existentes. Dessa maneira, a fitorremediação tem se mostrado uma boa candidata, apresentando uma excelente relação custo benefício, uma alternativa de remediação sustentável, exigindo o mínimo de intervenção e manutenção. No entanto, as condições impostas pela DAM dificultam o estabelecimento de plantas nesse ambiente, sendo que, uma das formas encontradas pelos vegetais para contornar essa situação é através do estabelecimento de associação com bactérias, que podem trazer benefícios às mesmas, como por exemplo, a remoção dos metais pesados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar microrganismos endofíticos que possam ser utilizados em processos de fitorremediação. Para tanto, foram coletadas amostras de tecidos vegetais de quatro espécies diferentes de plantas em Siderópolis (local impactado pela DAM) e Florianópolis (local não impactado) entre julho de 2012 a março de 2013. Foram isolados 192 microrganismos endofíticos, sendo 114 bactérias e 78 fungos. Dentre os isolados obtidos, apenas as bactérias endofíticas foram identificadas e caracterizadas quanto à resistência a metais pesados, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato inorgânico. Por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foram identificadas 94 bactérias. Dentre essas, 44 bactérias são provenientes de Siderópolis e 50 de Florianópolis, sendo os isolados agrupados em seis classes filogenéticas: Acidobacteriales, Actinobacteridae, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria. Os resultados demonstraram que dos isolados avaliados, pelo menos 20 apresentaram capacidade em tolerar elevadas concentrações dos íons metálicos Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} . Além disso, outras 14 cepas apresentaram habilidade em solubilizar fosfato inorgânico e um isolado apresentou o gene *nifD*, responsável pela

fixação de nitrogênio atmosférico. Três bactérias se sobressaíram nos testes realizados, sendo elas LAMA 1146 - *Bacillus* sp., LAMA 1170 - *Serratia marcescens* e LAMA 1179 - *Brevibacillus borstelensis*. As bactérias identificadas nesse trabalho têm potencial para aplicação em processos de fitorremediação.

Palavras-chave: drenagem ácida de minas (DAM), bactérias endofíticas, fitorremediação, metais pesados.

Abstract

Acid Mine Drainage (AMD) is the most significant impact on the carboniferous region of Santa Catarina State, with the pyrite oxidation (FeS_2) as the main responsible for the impact. Mining water, coal processing and tailings have low pH (<3) and high levels of heavy metal that affecting watersheds and soil. Conventional methods established to remedy this contaminated environment are often expensive, invasive and not use resources efficiently. Thus, phytoremediation has proven to be a good candidate with excellent cost-benefit, an alternative sustainable remediation that requires intervention and maintenance minimal. However, the conditions imposed by AMD difficult to establish plants in this environment, and one of the forms found by plants to overcome this situation was associated with bacteria that can benefits to them, such as removal of heavy metals. The objective of this study were identify and characterize endophytic microorganisms that can be used in phytoremediation processes. Thus, samples (roots and leaves) from four species of plants in Siderópolis (impacted by DAM) and Florianópolis were collected (not impacted) from July 2012 to March 2013. They were isolated 192 microorganisms, of these 114 were bacteria and 78 were fungi. Among the isolates, only bacteria were identified and characterized for heavy metal resistance, nitrogen fixation and phosphate solubilization. By partial sequencing of 16S rDNA were identified 94 endophytic bacteria. Among these, 44 bacteria were isolated from Siderópolis plants and 50 were isolated from Florianópolis plants and the isolates grouped into six phylogenetic classes: Acidobacteriales, Actinobacteridae, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria. The results showed that 20 bacterial isolates tolerated high concentrations of Zn^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} . In addition, 14 other isolates showed high phosphate solubilization ability and one isolate presented the *nifD* gene. The bacterial isolates LAMA 1146 - *Bacillus* sp, LAMA 1170 - *Serratia marcescens* and LAMA 1179 - *Brevibacillus borstelensis* were prominent in tests. The bacteria identified in this study have potential for use in phytoremediation processes.

Keywords: acid mine drainage (AMD), endophytic bacteria, phytoremediation, heavy metals.

Lista de Figuras

Figura 1: Bacias Hidrográficas do Sul Catarinense no contexto da Bacia Carbonífera (Fonte: PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014).	2
Figura 2: Localização da área de estudo no município de Siderópolis – SC. (A) Planta de localização da aérea de mineração, situado a oeste do perímetro urbano. (B) Imagem aérea do Campo Vila Funil Lagoa. (C) Imagem aérea da Lagoa ácida Língua do Dragão (Fonte: PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014; http://www.sideropolis.sc.gov.br/).	14
Figura 3: Localização da área controle em Florianópolis – SC. (A) Delimitação do Parque Estadual do Rio Vermelho em Florianópolis. (B) Imagem aérea do ponto controle 1, acesso pela Servidão Altino Manoel Claudino. (C) Imagem aérea do ponto controle 2, situado no acesso ao terminal lacustre do Rio Vermelho (Fonte: PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014; http://www.florianopolis.sc.gov.br/).....	18
Figura 4: Imagem dos pontos de coleta de água em Siderópolis (A) e Florianópolis (B), SC, (Imagem: do autor).	30
Figura 5: Densidade total (NMP.g ⁻¹) da comunidade bacteriana presente nos tecidos de <i>Eleocharis</i> sp., <i>Miconia ligustroides</i> , <i>Ocotea pulchella</i> e <i>Tibouchina ramboi</i> no isolamento realizado durante o período de inverno e primavera de 2012 em Siderópolis, SC.....	34
Figura 6: Densidade total (NMP.g ⁻¹) da comunidade bacteriana presentes nos tecidos de <i>Eleocharis</i> sp. <i>Miconia ligustroides</i> e <i>Ocotea pulchella</i> em isolamento realizado durante o período de primavera de 2012 e outono de 2013 em Florianópolis, SC.....	34
Figura 7: Percentual de microrganismos endofíticos isolados a partir de tecidos vegetais originários de plantas coletadas em Siderópolis e Florianópolis.	35

- Figura 8:** Distribuição percentual de isolados por tipo de tecido vegetal coletado nas amostras de Siderópolis/SC e Florianópolis/SC, em diferentes estações do ano. 37
- Figura 9:** Relações filogenéticas baseadas em sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir de bactérias endofíticas associadas com tecidos de *Eleocharis* sp., *Miconia ligustroides*, *Ocotea pulchella* e *Tibouchina ramboi* de amostras oriundas de Siderópolis e sequências de referência recuperadas do GenBank. Valores de bootstrap (n=1000) são indicados no nó..... 40
- Figura 10:** Relações filogenéticas baseadas em sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir de bactérias endofíticas associadas aos tecidos de *Eleocharis* sp., *Miconia ligustroides* e *Ocotea pulchella* de amostras oriundas de Florianópolis e sequências de referência recuperadas do GenBank. Valores de bootstrap (n=1000) são indicados no nó..... 46
- Figura 11:** Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores específicos do gene nifD. M: LowRanger 100bp DNA Ladder; B: controle e os códigos LAMA indicam os organismos avaliados. 64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies hiperacumuladoras de metal pesados.	6
Tabela 2: Dados referentes os parâmetros físico-químicos determinados durante as coletas realizadas em Siderópolis e Florianópolis, SC durante os meses de junho de 2012 e abril de 2013.....	29
Tabela 3: Valores médios ($\text{mg.L}^{-1} \pm$ desvio padrão ($n=3$)) de carbono inorgânico total (CIT), carbono orgânico total (COT) e carbono total (CT) de amostras de água de Siderópolis e Florianópolis, SC.....	29
Tabela 4: Valores médios \pm desvio padrão ($n=3$) de pH, fósforo disponível, nitrogênio total e carbono total de amostra de solos oriundos de Siderópolis e Florianópolis, SC.	31
Tabela 5: Concentração total de metais pesados (mg.L^{-1}) nas amostras de água de Siderópolis e Florianópolis, SC.....	32
Tabela 6: Concentração total de metais pesados (mg.kg^{-1}) nas amostras de solo de Siderópolis e Florianópolis, SC.	33
Tabela 7: Identificação, origem de isolamento, porcentagem de similaridade e número de cepas para cada unidade taxonômica operacional (OTU) identificadas no município de Siderópolis/SC. ..	41
Tabela 8: Identificação, origem de isolamento, porcentagem de similaridade e número de cepas para cada unidade taxonômica operacional (OTU) identificadas em Florianópolis/SC.	47
Tabela 9: Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) a Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} e a capacidade de solubilização de fosfato pelas bactérias endofíticas.	52
Tabela 10: Classificação quanto à resistência dos endofíticos aos metais pesados zinco, chumbo e cádmio.....	60
Tabela 11: Valores reportados para pH e metais dissolvidos em países impactados pela drenagem ácida de minas.	68

Sumário

_Toc405218474

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	Áreas de Estudo	12
3.1.1	Siderópolis	12
3.1.1.1	Localização e descrição da área de estudo	12
3.1.2	Florianópolis	15
3.1.2.1	Localização e descrição da área de estudo	15
3.2	Amostragem	19
3.2.1	Coletas de água	19
3.2.2	Coletas de solo.....	19
3.2.3	Coletas de plantas	19
3.3	Determinação das características físico-químicas nas matrizes ambientais	20
3.3.1	Avaliação do pH, temperatura e condutividade da água	20
3.3.2	Avaliação do pH do solo	20
3.3.2.1	Nutrientes inorgânicos no solo.....	20
3.3.3	Metais na água	21
3.3.4	Metais no solo	21
3.3.5	Carbono orgânico e inorgânico na água.....	21
3.3.5.1	Carbono total no solo	22
3.4	Isolamento e manutenção de microrganismos endofíticos	22
3.4.1	Processamento do material vegetal.....	22
3.4.2	Purificação das cepas.....	22
3.4.3	Armazenamento e manutenção das cepas isoladas	23
3.5	Identificação molecular das cepas isoladas.....	23
3.5.1	PCR de Colônia.....	23
3.5.2	Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16S rRNA.....	24
3.5.3	Sequenciamento do gene 16S rDNA	24
3.6	Caracterização bioquímica e fisiológica dos microrganismos endofíticos	25

3.6.1	Solubilização de Fosfato Inorgânico	25
3.6.2	Concentração Inibitória Mínima (MIC)	26
3.6.3	Fixação de Nitrogênio (amplificação por PCR dos genes nifD)	26
3.7	Tratamento de dados	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Análise dos dados físico-químicos das matrizes ambientais	28
4.2	Avaliação da Comunidade Bacteriana Endofítica Cultivável	33
4.3	Isolamento dos Microrganismos Endofíticos.....	34
4.4	Identificação Molecular	38
4.5	Caracterização Bioquímica e Fisiológica	51
5	DISCUSSÃO.....	65
5.1	Características dos Ambientes Estudados	65
5.2	Diversidade de Microrganismos Endofíticos nas Plantas Estudadas.....	69
5.3	Características Fisiológicas dos Microrganismos Endofíticos e seu Possível Papel nas Plantas	74
6	Conclusões	77
7	Considerações Finais.....	78
8	REFERÊNCIAS	79
	ANEXOS.....	93

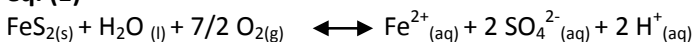
1 INTRODUÇÃO

A atividade humana na biosfera, especialmente na era industrial, constitui uma ameaça sem precedentes, devido à interferência direta e indireta no equilíbrio ecológico. As atividades industriais, como mineração, fundição, fabricação de produtos químicos, fábricas de papel, curtumes, fábricas têxteis, indústria petroquímica e agricultura intensiva são particularmente culpadas por poluir o ambiente (WONG, 2003; FREITAS et al., 2004).

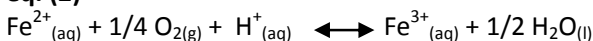
Os problemas ambientais resultantes dessas atividades estão se tornando cada vez mais graves e, eventualmente, representando uma ameaça significativa para a saúde humana e para a segurança alimentar, uma vez que tem se detectado nos diferentes recursos naturais uma grande variedade de produtos químicos, como por exemplo, metais pesados, solventes clorados e pesticidas (MANSOUR; GADE, 2010). Análises genéricas indicam que cerca de 30.000 substâncias perigosas estão presentes em esgotos urbanos e pouco se sabe sobre sua toxicidade e destino nos ambientes (PALMQUIST; HANÆUS, 2004).

A mineração de carvão compõe uma dessas atividades poluidoras, gerando a drenagem ácida de mina (DAM), material este caracterizado por apresentar baixos valores de pH (<3,0) e elevadas concentrações de metais, tais como ferro, alumínio, manganês, cobre, zinco, chumbo e sulfatos, oriundos da lixiviação ácida sobre as matrizes geológicas. De acordo com Mello e Abraão (1998), a pirita (FeS_2) é o principal mineral sulfetado capaz de produzir drenagem ácida de mina. A DAM é formada através de uma sequência de mecanismos de reações de oxidação de sulfetos, catalisados por processos microbiológicos que atuam principalmente quando o pH atinge valores inferiores a 3,5. Os mecanismos de reações podem ser representados pelas equações abaixo (MELLO E ABRAÃO, 1998):

eq. (1)

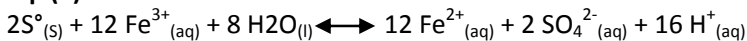


eq. (2)

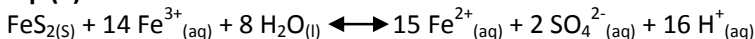


eq. (3)



eq. (4)

Essa etapa ocorre se o pH for maior do que 3,0, onde a oxidação do hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) começa a ocorrer.

eq. (5)**eq. (6)**

Essas duas últimas reações são mediadas principalmente pela bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

A poluição causada pela DAM é o impacto mais significativo na região carbonífera do Estado de Santa Catarina. A água derivada da mineração, do processamento e seus rejeitos locais afeta os fluxos de três bacias hidrográficas: Rio Araranguá, Rio Tubarão e Rio Urussanga (Figura 1).

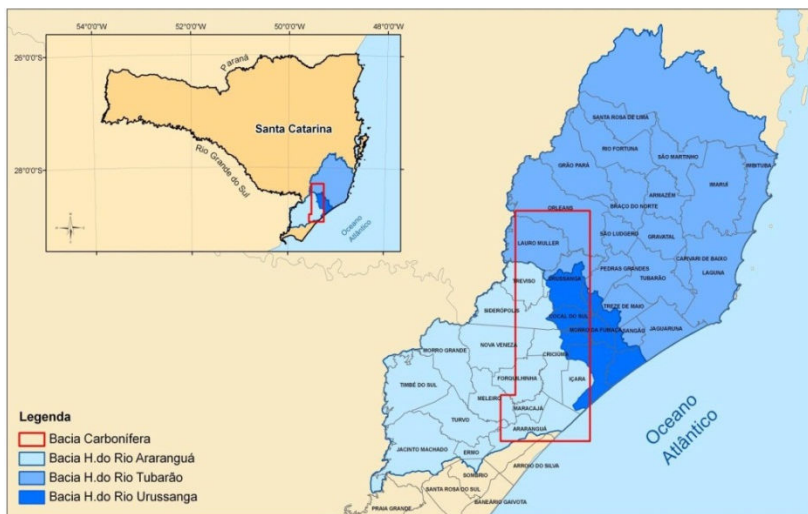


Figura 1: Bacias Hidrográficas do Sul Catarinense no contexto da Bacia Carbonífera (Fonte: PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014).

A instalação da atividade mineradora em Santa Catarina iniciou por volta de 1895 com o objetivo de suprir a demanda deste recurso

mineral para fins energéticos. A partir de 1945, além de atender o setor energético, o carvão mineral passou a ser utilizado no país para a produção e beneficiamento do aço.

Durante este século de exploração de carvão no sul do Estado, ocorreram inúmeros danos ambientais, em especial a contaminação dos recursos hídricos, a destruição de vegetação e a perda de utilidade de extensas áreas. Estima-se hoje que existam aproximadamente 6.400 hectares de áreas terrestres degradadas pela mineração de carvão na região, além de cerca de 800 bocas de minas abandonadas, contribuindo para a degradação das bacias hidrográficas (PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014).

A acidificação dos recursos hídricos potencializa o aumento da solubilidade de metais, o que resulta no acúmulo desses elementos muitas vezes tóxicos no ambiente (LEDIN; PEDERSEN, 1996). Como consequência, esses ambientes se tornam inapropriados para a maioria dos seres vivos, sendo habitados principalmente por microrganismos capazes de tolerar a acidez e a alta concentração de metais pesados, os quais podem acumular-se nos organismos causando efeitos adversos e tóxicos nos níveis moleculares e celulares (GEREMIAS et al., 2012). As várias combinações de acidez e íons metálicos fazem com que cada efluente de mineração seja único.

Os rejeitos de minas geralmente possuem condições desfavoráveis para a promoção da cobertura vegetal natural nesses ambientes, uma vez que, apresentam baixo pH, concentração elevada de metais tóxicos, baixa capacidade de retenção de água e baixos níveis de nutrientes para as plantas. Especificamente metais não são degradáveis e, conseqüentemente, podem persistir por longos períodos nos ambientes aquáticos, assim como nos ambientes terrestres (ASHRAF et al., 2011).

A contaminação do ambiente por metais pesados tem se tornado um problema global, que afeta a fertilidade do solo, a produtividade das culturas, e leva à bioacumulação desses elementos na cadeia alimentar (BHARGAVA et al., 2012; RAJKUMAR et al., 2009). Os países industrializados têm regulado a emissão de substâncias tóxicas, mas nos países em desenvolvimento, o rápido crescimento industrial e a explosão populacional, juntamente com a falta de controle da poluição, têm causado um enorme aumento na

contaminação por metais pesados nos solos agrícolas (BHARGAVA et al., 2012).

Esses solos contaminados por metais pesados representam um sério perigo à saúde humana, bem como para as plantas e animais, devido à sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. Os metais são conhecidos por interferir no funcionamento fisiológico e bioquímico das plantas, resultando em alterações na composição, rigidez, fluidez, fluxo hídrico e de nutrientes, redução no crescimento de tecido e de biomassa, interferência no ciclo e divisão celular, e ainda alterar a produção de clorofila e consequentemente o processo de fotossíntese, incluindo o estresse oxidativo (GEREMIAS et al., 2012). Assim, uma vez que esses contaminantes afetam seriamente os ecossistemas e induzem riscos potenciais à saúde humana, deve-se desenvolver métodos de remediação para tais contaminantes.

Os métodos convencionais estabelecidos para remediar os ambientes contaminados são frequentemente caros, ambientalmente invasivos, trabalhosos e não fazem uso eficaz dos recursos existentes, especialmente no caso de áreas contaminadas em grande escala. Dessa maneira, a fitorremediação tem se mostrado uma boa candidata, que apresenta uma excelente relação custo benefício, uma alternativa de remediação sustentável, pois funciona *in situ*, é movida à energia solar, exigindo o mínimo de intervenção e manutenção.

A remediação *in situ* utilizando plantas vem demonstrando benefícios em comparação aos métodos físico-químicos tradicionais, uma vez que possibilita tanto a detoxificação de resíduos perigosos como a reconstituição do local degradado e ainda possui a vantagem de ser um método mais econômico (ASHRAF et al., 2011).

As plantas podem ser utilizadas para estabilizar a superfície, reduzindo a erosão, tornando-se um meio alternativo de diminuir o risco ambiental representado pelos rejeitos de minas. Esta opção é chamada fitoestabilização e considera o uso de espécies vegetais tolerantes a metais para imobilizar metais pesados através da absorção e acumulação pelas raízes ou precipitação dentro da rizosfera (WONG, 2003). Estes processos diminuem a mobilidade dos metais e também reduzem a probabilidade destes entrarem na cadeia alimentar. Portanto, a utilização da flora metal tolerante representa uma solução de baixo custo a longo prazo (ASHRAF et al., 2011).

A disponibilidade dos metais pesados no solo é um fenômeno natural de seleção para as plantas. As plantas capazes de tolerarem altas concentrações de metais pesados desenvolveram esta habilidade por meio de duas estratégias básicas (ASHRAF et al., 2011; BHARGAVA et al., 2012). A primeira estratégia é denominada acumulação, em que o metal pode ser acululado nas plantas, tanto em baixas quanto em altas concentrações de metais presentes no solo (McGRATH et al., 2001). Essas plantas são capazes de armazenar os metais de várias maneiras, como por exemplo, vinculando-os às paredes celulares, compartimentalizando em vacúolos ou complexando-os a determinados ácidos orgânicos ou proteínas (ASHRAF et al., 2011). Já a segunda estratégia é conhecida como estratégia de exclusão, onde o transporte de metais pesados para a parte aérea e folhas é limitado por uma gama de concentrações de metais no solo. Algumas plantas fazem complexos de metais estáveis nas células da raiz para prevenir a translocação de metais das raízes para os tecidos aéreos.

Plantas hiperacumuladoras formam um subgrupo de espécies muitas vezes endêmicas de solo naturalmente mineralizado e que acumulam altas concentrações de metais em seus tecidos (BHARGAVA et al., 2012). A hiperacumulação de íons de metais pesados é um fenômeno marcante exibido por um número inferior 0,2% de angiospermas (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011; BHARGAVA et al., 2012). Essa capacidade foi relatada em mais de 450 espécies de plantas vasculares de 45 famílias de angiospermas (Tabela ZWZ), incluindo membros da família Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunoniaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae e Violaceae (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007), mas está bem representada pela família Brassicaceae, em especial pelos gêneros *Alyssum* e *Thlaspi* capazes de acumular mais do que um metal (BHARGAVA et al., 2012).

As plantas tolerantes aos metais tóxicos apresentam uma série de mecanismos que controlam a homeostase, como a detoxificação e tolerância de metais pesados (HALL, 2002). Os principais processos envolvidos neste controle são: a absorção pelas raízes, o transporte para as partes aéreas, a complexação através de moléculas quelantes e a compartimentalização no vacúolo (HALL, 2002).

Tabela 1: Espécies hiperacumuladoras de metal pesados.

Família	Espécie	Metais	Referência
Asteraceae	<i>Picris divaricata</i>	Zn	DU et al. , 2011
	<i>Berkheya coddii</i>	Ni	MORADI et al. , 2010
	<i>Thlaspi goesingense</i>	Ni	IDRIS et al. , 2004
	<i>Alyssum bertolonii</i>	Ni	BARZANTI et al. , 2007
Brassicaceae	<i>Brassica napus</i>	Pb	SHENG et al. , 2008
	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd, Pb e Zn	LODEWYCKX et al. , 2002; ENT et al. , 2013
	<i>Alyssum serpyllifolium</i>	Ni	ALVES et al. , 2011
	<i>Arabis paniculata</i>	Cd, Pb e Zn	ENT et al. , 2013
Ciperaceae	<i>Cyperus rotundus</i>	Sn	ASHRAF et al. , 2011
	<i>Fimbristylis bisumbellata</i>	Mg e Pb	MAZUMDAR; DAS, 2014
Lamiaceae	<i>Elsholtzia splendens</i>	Cu	ENT et al. , 2013
	<i>Geniosporum tenuiflorum</i>	Cu	RAJAKARUNA; BAKER, 2006
	<i>Haumaniastrum robertii</i>	Co	BHARGAVA et al. , 2012
Melastomataceae	<i>Melastoma malabathricum</i>	Sn	ASHRAF et al. , 2011
Mirtaceae	<i>Austromyrtus bidwillii</i>	Mn	BHARGAVA et al. , 2012
Poaceae	<i>Imperata cylindrica</i>	Pb	ASHRAF et al. , 2011
	<i>Leersia hexandra</i>	Cr	ZHANG et al. , 2007

O sucesso da fitorremediação de metais depende da capacidade da planta em tolerar e acumular concentrações elevadas de metais, obtendo-se uma grande biomassa vegetal (GRCMAN [et al.](#), 2001). Devido a essa característica, cientistas, engenheiros e profissionais de remediação ambiental têm focado seus estudos em plantas capazes de hiperacumular metais pesados. Um dos caminhos elucidados para as plantas superarem as condições adversas do solo são as associações simbióticas com microrganismos (POSTMA [et al.](#), 2007). As associações entre plantas e microrganismos metatolerantes tem recebido especial atenção, devido ao potencial dos microrganismos em bioacumular metais em ambiente poluído bem como seus efeitos sobre a mobilização/imobilização de metais. Por consequência, esta associação aumenta a absorção de metais e o crescimento das plantas, sendo que o uso sinérgico de plantas e microrganismos é favorável para a descontaminação de solos metálicos (JING [et al.](#), 2007; GLICK, 2010; MA, 2011). Ainda assim, mesmo que o microrganismo não tenha capacidade de tolerar o metal pesado, sua relação com a espécie vegetal permite à planta bioacumuladora/tolerante melhorar seu desenvolvimento no ambiente contaminado.

Nos últimos anos, uma série de pesquisas trouxe à tona o papel das bactérias endofíticas na fitoextração de poluentes (BHARGAVA et al., 2012), que são definidas como os organismos que colonizam os tecidos internos das plantas, sem causar infecções sintomáticas ou efeitos negativos sobre o seu hospedeiro (SCHULZ; BOYLE, 2006).

Embora as bactérias endofíticas ocorram de forma transitória e variável (VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008), elas são muitas vezes capazes de provocar alterações fisiológicas fundamentais que promovem o crescimento e o desenvolvimento da planta (CONRATH et al., 2006). Em geral, os efeitos benéficos dos endófitos são maiores do que os de muitas rizobactérias (PILLAY; NOWAK, 1997) e estes podem ser potencializados quando a planta encontra-se em sua fase de crescimento, quer sob condições de estresse biótico ou abiótico (BARKA et al., 2006; HARDOIM et al., 2008). Endófitos resistentes a metais também podem promover a tolerância nas plantas hospedeiras, aumentando a acumulação desses elementos (KABAGALE et al., 2010).

Apesar de mostrar-se promissora, a fitorremediação ainda tem que lidar com algumas limitações importantes, como a fitotoxicidade, a absorção limitada de contaminantes, a evapotranspiração de contaminantes voláteis orgânicos e o baixo porte vegetal. Uma das maneiras possíveis para contornar estas limitações se dá também pela associação entre a planta e os microrganismos endofíticos (WEYENS et al., 2009a; 2009b). A fitotoxicidade e a evapotranspiração podem ser consideravelmente diminuídas no processo de fitorremediação, utilizando microrganismos endofíticos adequados e que disponham de vias de degradação apropriadas (BARAC et al., 2004; TAGHAVI et al., 2005; WEYENS et al., 2011). Além disso, as bactérias endofíticas provaram ser capazes de aumentar o crescimento das plantas por vários mecanismos, incluindo a produção de sideróforos, fixação de nitrogênio, mecanismo ACC desaminase (ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico), ácido indole-3-acético (AIA) e a solubilização de fosfato (RAJKUMAR; FREITAS, 2009). Do mesmo modo, certos endófitos também têm demonstrado a capacidade de alterar a toxicidade/disponibilidade de metais pesados para as plantas pela ação de sideróforos, biosurfactantes e ácidos orgânicos (SHENG et al., 2008).

Muitos trabalhos revelaram que as plantas hiperacumuladoras de metais são colonizadas simultaneamente por um elevado número

de diferentes bactérias endofíticas, sendo esses microrganismos capazes de melhorar o crescimento da planta. Além disso, muitos dos microrganismos encontrados colonizando os tecidos vegetais apresentaram genes responsáveis pela resistência aos metais pesados, destacando-se os gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Leifsonia*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Staphylococcus* (RAJKUMAR et al. 2009a; 2009b).

As bactérias endofíticas também podem contribuir para a redução da fitotoxicidade dos metais pesados por meio de mecanismos de biossorção e bioacumulação. Uma vez que as células bacterianas apresentam elevada superfície de contato, podem absorver maior quantidade de metais pesados do que os componentes inorgânicos do solo (MA et al., 2011). Vários autores reportaram que mecanismos de biossorção/bioacumulação bacterianos, associados aos fatores promotores do crescimento das plantas (incluindo a atividade de ACC deaminase e fitohormônios) foram responsáveis por um melhor crescimento das plantas em solos contaminados por metais (ZAIDI et al., 2006; MADHAIYAN; POONGUZHALLI; SA, 2007; KUMAR et al., 2009).

O fósforo (P) e o nitrogênio (N) são os principais macronutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento biológico das plantas. Fósforo é frequentemente o nutriente mineral mais limitante para a produção de biomassa, e os níveis elevados de metais pesados no solo interfere em sua captação, pois são formados compostos de fósforo insolúveis e assim, levando em muitos casos a inibição do crescimento vegetal (MA et al., 2011). Muitas bactérias endofíticas resistentes a metais pesados são capazes de converter fosfatos insolúveis em formas disponíveis para as plantas através de acidificação, quelação, reações de troca e liberação de ácidos orgânicos ou mineralizar fosfatos orgânicos através da secreção de fosfatases extracelulares (MA et al., 2011). O nitrogênio por sua vez, é o nutriente responsável pelo crescimento das plantas, produção de novas células e por promover a formação de clorofila e a síntese de proteínas. As plantas adquirem o nitrogênio, através das formas preferências de nitrato e amônio, mas em ambientes extremamente ácidos a absorção desses compostos é comprometida.

O etileno (C_2H_4) desempenha papel central na modulação do crescimento e metabolismo celular das plantas. No entanto, o estresse ocasionado pela alta concentração de metais pesados no solo, acelera a síntese de etileno, provocando a inibição do alongamento radicular, crescimento de raízes laterais e formação de pelos radiculares, ocasionando danos ao organismo (KUFFNER et al., 2010; MA et al., 2011). Algumas bactérias endofíticas são capazes de aliviar os efeitos mediados pelo etileno em plantas por meio da hidrólise enzimática de 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), uma vez que a enzima ACC deaminase está envolvida na via de biossíntese de etileno (KUFFNER et al., 2010; JASIM et al., 2013).

Produtos microbianos endofíticos podem apresentar inúmeros efeitos significativos sobre as plantas, uma vez que são produtores de fitormônios, como auxinas (em especial ácido indolacético - AIA), citocininas e giberelinas e estes, desempenham papéis fundamentais nas etapas de desenvolvimento vegetal, como estimular a germinação, crescimento, reprodução, proteger as plantas contra estresses bióticos e abióticos, além de promover o alongamento e divisão celular e a diferenciação de várias plantas (JASIM et al., 2013).

As bactérias endofíticas além de produzirem e disponibilizarem fatores de crescimento para as plantas hospedeiras são capazes ainda de proporcionar proteção contra fungos e bactérias, doenças virais, insetos e nematódeos por vários mecanismos, dentre os quais destacam os sideróforos (através da redução na disponibilidade de ferro para patógenos que são dependentes do elemento), enzimas líticas da parede celular, antibióticos e indução da resistência sistêmica nas plantas (MA et al., 2011).

O ferro é um nutriente essencial para praticamente todas as formas de vida, pois atua como cofator em muitas reações enzimáticas. No entanto, em ambiente aeróbio, o ferro é encontrado principalmente como ferro Fe^{3+} e tende a formar hidróxidos insolúveis, tornando-se praticamente indisponível para os organismos. Para adquirir quantidade suficiente de ferro, as bactérias desenvolveram estratégias para solubilizar este metal para sua captação. Uma das estratégias mais comumente encontrada é a produção de sideróforos, moléculas de baixo peso molecular quelantes de ferro. Além do ferro, sideróforos bacterianos, também podem formar complexos estáveis

com outros metais, tais como Al, Cu, Ga, In, Pb e Zn. Sob tais condições, a produção desses sideróforos oferece um sistema de resgate biológico que é capaz de quelar Fe e outros metais, podendo torná-los disponíveis para as plantas (RAJKUMAR et al., 2010).

Considerando estas características benéficas, a inoculação de bactérias resistentes a metais possivelmente contribuirá para o aumento do crescimento da planta e potencializando a fitorremediação de solos contaminados por metais e outros poluentes. Este efeito já foi observado em experimentos *in vitro* para o tolueno (BARAC et al., 2004; TAGHAVI et al., 2005), níquel (LODEWYCKZ, 2001) e para as contaminações simultâneas de tolueno e níquel (WEYENS et al., 2011). Barac e colaboradores (2004) também observaram que plantas inoculadas com endofíticos tinham a capacidade de reduzir significativamente a fitovolatilização de tolueno (50-70 %) e reduzir seu efeito fitotóxico nas plantas inoculadas.

Além disso, vale ressaltar que, das quase 300 mil espécies de plantas que existem no planeta, apenas algumas delas foram estudadas em relação a esta associação (STROBEL; DAISY, 2003). Consequentemente, a oportunidade de encontrar novos e interessantes microrganismos endofíticos entre as inúmeras plantas em diferentes ambientes e ecossistemas é grande, o que pode proporcionar possibilidades interessantes para processos biotecnológicos. A revisão de Strobel e Daisy (2003) demonstrou como é importante compreender os métodos e fundamentos usados para isolar novos microrganismos endofíticos, bem como seus produtos bioativos.

Nesse trabalho convergimos esforços na bioprospecção de microrganismos endofíticos presentes em ambientes impactados com os passivos da mineração de carvão do município de Siderópolis, objetivando isolar cepas valiosas em relação à resistência a metais pesados, para futuramente serem testadas em processos de detoxificação de metais e promoção do crescimento vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Identificar e caracterizar microrganismos endofíticos associados às plantas de áreas impactadas pela mineração de carvão, assim como avaliar seus potenciais para utilização em processos de biorremediação/fitorremediação de áreas degradadas.

2.2 *Objetivos Específicos*

- a) Diferenciar os dois ambientes estudados em relação a parâmetros físico-químicos e químicos.
- b) Isolar microrganismos endofíticos do tecido de plantas de áreas impactadas pela mineração de carvão em Santa Catarina e área controle.
- c) Identificar as bactérias endofíticas isoladas.
- d) Avaliar e selecionar microrganismos que apresentem resistência a metais pesados.
- e) Avaliar os microrganismos quanto à sua capacidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato.
- f) Indicar microrganismos endofíticos resistentes a metais pesados e que promovam o aumento do crescimento das plantas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de Estudo

3.1.1 Siderópolis

O município de Siderópolis situa-se na Região da Associação dos Municípios da Região Carbonífera (AMREC). No setor econômico destaca-se a mineração de carvão e a agropecuária com a produção de carne (principalmente de aves e suínos), banana, arroz, feijão, mandioca, milho e uva (IBGE, 2012).

A mineração de carvão no município de Siderópolis iniciou no ano de 1947 na porção leste do Campo Vila Funil pela Carbonífera Próspera S.A. de propriedade do Governo Federal, atualmente Companhia Siderúrgica Nacional (CSN). Na década de 1980 a CSN encerrou suas atividades no Campo Vila Funil, sendo seus títulos minerários foram transferidos para outras empresas mineradoras (Cocalit – Coque Catarinense Ltda., Carbonífera Belluno Ltda. e Indústria Carbonífera Rio Deserto Ltda.) após o ano de 1991 (CTCL, 2013).

Somente em 2000 os passivos ambientais decorrentes de anos de mineração de carvão foram estimados através da ação civil pública proposta pelo Ministério Público Federal, onde as empresas apresentaram “um projeto de recuperação da região que compõe a Bacia Carbonífera do Sul do Estado” contemplando “as áreas de depósitos de rejeitos, áreas mineradas a céu aberto e minas abandonadas, bem como o desassoreamento, fixação de barrancas, descontaminação e retificação dos cursos d’água, além de outras obras que visem amenizar os danos sofridos principalmente pela população dos municípios-sede da extração e do beneficiamento...” (PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014).

3.1.1.1 Localização e descrição da área de estudo

A área de estudo, denominada popularmente “Língua do Dragão”, está situada no município de Siderópolis/SC (Figura 2) a oeste do centro urbano do município entre as coordenadas 28° 35’ S e 49°

27' O. Essa região caracteriza-se pela presença de um conjunto de lagoas ácidas oriundas das antigas cavas de mineração a céu aberto formadas principalmente por pilhas de estéreis e depósitos de rejeitos, originados através do beneficiamento de carvão, fruto do desenvolvimento da lavra, e que contribuem significativamente na geração de DAM. Esses corpos hídricos drenam suas águas para uma única lagoa – a “Língua do Dragão”.

O clima no município de Siderópolis, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo Cfa – mesotérmico úmido sem estação seca definida, com temperaturas médias anuais oscilando entre 16 °C e 18 °C. Apresentam verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão (SANTA CATARINA, 1991).

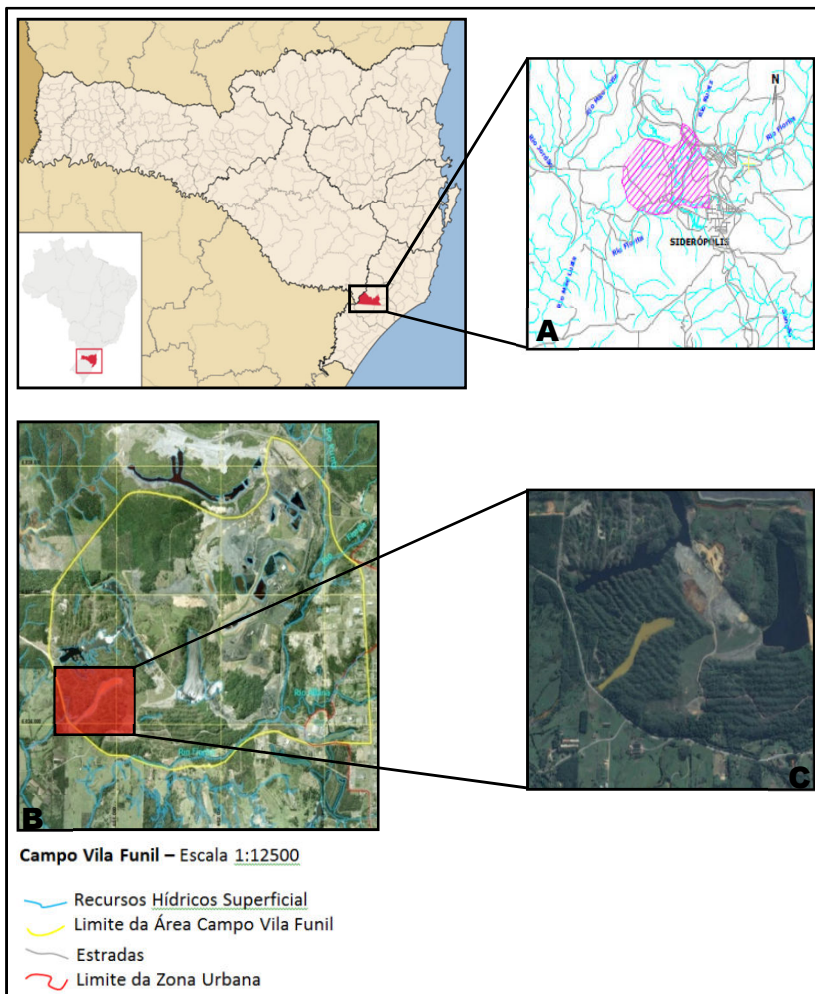
O ambiente pesquisado situa-se na borda leste da Bacia Sedimentar do Paraná, onde se encontram rochas de natureza ígnea e sedimentar nos quais estão associadas várias camadas de carvão (SANTOS, 2003). Em Siderópolis constata-se a presença de rochas pertencentes às formações Irati, Serra Geral, Palermo e Rio Bonito, estando associados ainda depósitos aluviais, conforme os cursos d'água que drenam a área.

Os solos da área são derivados principalmente da formação Rio Bonito e compostos basicamente por arenitos cinza-claro (fino a médio), com intercalações de siltitos cinza, folhelhos e camadas de carvão (KREBS, 1997). No entanto, devido ao processo de mineração a céu aberto, os solos foram descaracterizados, restando no local uma mistura dos horizontes do solo com a rocha matriz e os estéreis oriundos do processo de lavra.

O local de estudo pertence à bacia hidrográfica do Rio Fiorita, afluente da margem esquerda do rio Mãe Luzia, tributário da bacia hidrográfica do Rio Araranguá. O rio Fiorita nasce a nordeste do município de Siderópolis e corta a região de lavra denominada Campo Vila Funil.

Nessa região encontram-se lagoas ácidas formadas pelas antigas cavas de mineração a céu aberto e que contribuem com grande expressividade para a geração de DAM. Esses corpos hídricos drenam suas águas para a lagoa “Língua do Dragão”, área considerada crítica e de difícil recuperação devido aos diversos contribuintes de

contaminantes. A lagoa apresenta águas com elevadas concentrações em metais que deságuam diretamente no rio Fiorita, comprometendo ainda mais a qualidade da bacia hidrográfica do rio Araranguá.



PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014; <http://www.sideropolis.sc.gov.br/>).

A cobertura vegetal original da área estudada é representada pela Floresta Ombrófila Densa, que pode ser dividida em três tipos de formações a Floresta de Terras Baixas, a Floresta Submontana e a Floresta Montana. Em Siderópolis ocorre predomínio da Floresta Submontana (TEIXEIRA et al., 1986). Ao longo dos anos essa cobertura foi sendo removida para dar lugar as principais atividades econômicas – carbonífera e agropecuária. Atualmente a cobertura florestal existente ocorre como mosaicos, formada principalmente por capoeirões e florestas secundárias. Além disso, espécies exóticas como eucalipto e pinus foram introduzidas e disseminadas na região, tanto para suprir a demanda de madeira nas propriedades rurais, como nos processos de recuperação da cobertura vegetal nas áreas mineradoras, o que coloca em risco a dinâmica sucessional de reconstituição natural e nativa da floresta típica da região.

3.1.2 Florianópolis

A ilha de Santa Catarina situa-se entre os paralelos 27°10' e 27°50' de latitude sul e entre os meridianos 48°25' e 48°35' de longitude oeste, possui uma área de 424,40km², compreendendo uma extensão de 54 km no sentido norte-sul e 18 km no sentido leste-oeste, que corresponde à parte insular do município de Florianópolis, capital do estado de Santa Catarina (SILVA; FILHO, 2011). Devido as suas características físicas (insular e relevo acidentado) e naturais (diversidade de ecossistemas) a ilha atraiu historicamente visitantes devido a sua incontestável beleza natural, alavancando o setor turístico catarinense. Outro setor econômico em destaque na ilha de Santa Catarina é o centro político-administrativo do Estado, consolidando o núcleo urbano e a prestação de serviço.

3.1.2.1 Localização e descrição da área de estudo

O Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERVE) localizado na costa nordeste da ilha ocupa uma área total de 1.532 hectares. Dois pontos do parque serviram como áreas controles do estudo conforme figura 3.

Ponto 1: Servidão Altino Manoel Claudino

O primeiro ponto de coleta na área controle situa-se no logradouro Servidão Altino Manoel Claudino localizado entre as coordenadas 27° 30' S e 48° 24' O.

Ponto 2: acesso ao Terminal Lacustre do Rio Vermelho.

O segundo ponto de coleta na área controle situa-se na rua de acesso ao terminal lacustre do Rio Vermelho localizado entre as coordenadas 27° 32' S e 48° 26' O.

Os dois pontos escolhidos como área controle foram definidos em virtude da presença das espécies vegetais encontradas na Lagoa Língua do Dragão e também por não apresentar impacto pela mineração.

O clima segundo classificação de Köppen também é Cfa (mesotérmico úmido sem estação seca). A temperatura média anual situa-se em torno de 20°C junto à orla marítima e 22°C mais no interior da ilha, o que demonstra a amenidade do clima junto ao mar. A temperatura média mensal é de 24°C em janeiro e 16°C em julho (SANTA CATARINA, 1991). O clima dessa região sofre influência de duas massas de ar, denominadas Tropical Atlântica e Polar Atlântica.

A Ilha de Santa Catarina apresenta duas grandes unidades geológicas, o embasamento cristalino e os depósitos quaternários de planície costeira, depositados no Pleistoceno e Holoceno (SILVA; FILHO, 2010).

A Lagoa da Conceição caracteriza-se como uma laguna estrangulada, uma vez que, verifica-se a existência de um canal meandriforme permitindo sua ligação com o oceano.

As áreas controles apresentam predominantemente sedimentos paludiais, turfáceos, depósitos eólicos, depósitos lagunares e depósito marinho praiado (HERBELE, 2011; SILVA; FILHO, 2010). O ponto de coleta um apresenta solo constituído basicamente por Neossolos Quartzarênicos. Esse local situa-se em uma depressão situada intra-cordões, semi alagada, associada à depósitos de turfa (HEBERLE, 2011). O ponto de coleta dois apresenta uma composição de solo mista formada por Neossolos, Espodossolos e Organossolos (HEBERLE, 2011).

Os pontos de coleta controle pertencem à bacia hidrográfica Lagoa da Conceição, que abrange uma área total de 116 km², se

estendendo desde o norte do bairro Rio Vermelho, limitado a oeste pela dorsal do morro de Ratoles até o morro do Badejo, no Canto da Lagoa limite com o bairro do Rio Tavares.

Os recursos hídricos de água doce que alimentam a Lagoa possuem três origens: contribuição das precipitações pluviométrica (águas das chuvas), dos riachos situada a oeste da Lagoa e das vazões dos rios Vermelho e João Gualberto (Odreski, 2012).

A vegetação na área controle encontra-se adulterada, devido à presença de reflorestamento com espécies exóticas (Pinus e Eucalipto), que ocupam o espaço que naturalmente seria de domínio da Vegetação Litorânea de Restinga e da Floresta Ombrófila Densa. No ponto de coleta um ocorre predomínio de depósito turfáceo (grande presença de *Sphagnum* sp.), dificultando a drenagem e apresentando elevada quantidade de matéria orgânica.

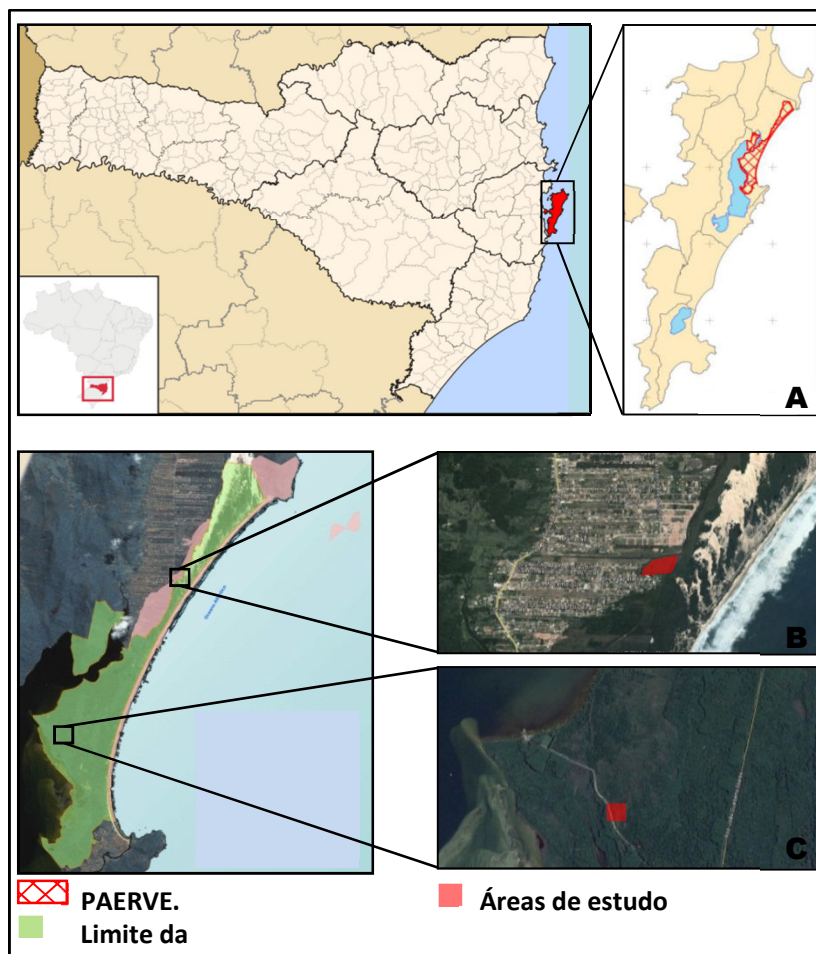


Figura 3: Localização da área controle em Florianópolis – SC. (A) Delimitação do Parque Estadual do Rio Vermelho em Florianópolis. (B) Imagem aérea do ponto controle 1, acesso pela Servidão Altino Manoel Claudino. (C) Imagem aérea do ponto controle 2, situado no acesso ao terminal lacustre do Rio Vermelho (Fonte: PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA, 2014; <http://www.florianopolis.sc.gov.br/>).

3.2 Amostragem

As coletas do presente trabalho ocorreram entre julho de 2012 a março de 2013.

3.2.1 Coletas de água

Para análise de nutrientes e metais presentes na água foram coletadas aproximadamente 2 litros, as amostras foram acondicionadas em garrafas de vidro estéreis (500 mL), devidamente identificadas e armazenadas em caixa térmica com gelo durante o transporte ao laboratório. No laboratório, a água foi filtrada (porosidade 0,7 μm) e congelada para posterior análise.

3.2.2 Coletas de solo

Para as análises de nutrientes e metais presentes no solo, as amostras foram coletadas removendo-se a cobertura de folhas superficial do solo e cavando-se aproximadamente 40 cm e recolhendo-se amostras de 500g em potes plásticos estéreis, devidamente identificados e armazenados em caixa térmica com gelo durante o transporte ao laboratório. No laboratório as amostras foram peneiradas, secas e encaminhadas para análise, ficando no laboratório réplicas das amostras de solo mantidas a -20°C .

3.2.3 Coletas de plantas

A escolha das plantas para o presente trabalho levou em consideração sua proximidade com a drenagem ácida de minas. As espécies vegetais foram identificadas pelo Prof. Dr. Rafael Trevisan (BOT – CCB – UFSC), e depositadas no Herbário FLOR (Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina).

Foram coletadas folhas e raízes de 4 espécies de plantas sadias em Siderópolis e 3 espécies de plantas sadias em Florianópolis (não apresentavam manchas ou qualquer tipo de lesão causada por patógenos, insetos ou danos mecânicos). As amostras foram inseridas em sacos plásticos estéreis e identificadas, a fim de reduzir a

contaminação externa. Esse material foi acondicionado em caixa térmica com gelo para transporte até o laboratório onde foi processada.

Espécies vegetais:

Siderópolis: *Eleocharis* sp., *Miconia ligustroides* (DC.) Naudin, *Ocotea pulchella* (Nees) Mez e *Tibouchina ramboi* Brade.

Florianópolis: *Eleocharis* sp., *Miconia ligustroides* (DC.) Naudin e *Tibouchina ramboi* Brade. *Ocotea pulchella* (Nees) Mez não foi encontrada em Florianópolis, pois trata-se de uma espécie que ocorre em regiões de altitude (serras e montanhas).

As espécies *Miconia ligustroides* e *Ocotea pulchella* apresentam hábito arbóreo e compõe o grupo ecológico de mata secundária inicial a tardia. *Eleocharis* sp. apresenta hábito herbáceo sendo componente de mata secundária tardia a climácica e *Tibouchina ramboi* apresenta hábito arbustivo e compõe o grupo ecológico de mata pioneira a secundária inicial (WURDACK, 1962; SOUZA, 1986; TREVISAN, 2009).

3.3 Determinação das características físico-químicas nas matrizes ambientais

3.3.1 Avaliação do pH, temperatura e condutividade da água

No momento das coletas, os parâmetros de pH, temperatura e condutividade elétrica foram analisados com auxílio de um multianalisador Horiba para as amostras de água. A temperatura do ar foi determinada com o auxílio de um termômetro de mercúrio.

3.3.2 Avaliação do pH do solo

A determinação do pH foi realizada potenciometricamente na suspensão solo-solução (água – KCl 1N) 1:2,5 mL com tempo de contato de uma hora, de acordo com Embrapa (1997).

3.3.2.1 Nutrientes inorgânicos no solo

A determinação de fósforo total nas amostras de solo foi realizada a partir de alíquotas de 1 g de solo seco em estufa a 45°C e

peneirado (malha de 2 *mash*). A determinação de fósforo total remanescente em solução foi realizada de acordo com o método de Murphy & Riley (1962) e a quantidade de nitrogênio total foi determinada pelo método de Kjeldahl, de acordo com o manual da Embrapa (1997). As análises foram realizadas pelo Laboratório de Solos, Água e Tecido Vegetal do Departamento de Engenharia Rural, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.3.3 Metais na água

Para a determinação dos metais cádmio, chumbo, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco nas amostras de água oriundas de Siderópolis e Florianópolis, foram previamente mineralizadas por digestão ácida e medidas por espectrometria de absorção atômica, com fonte de plasma, de acordo o método APHA 3120 B (2005). As análises foram realizadas pela Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental, Viamão, RS.

3.3.4 Metais no solo

A determinação dos metais cádmio, chumbo, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco nas amostras de solo oriundas de Siderópolis e Florianópolis foram estimadas pelo método de digestão ácida USEPA 3050b (1996). Esse método convencional libera os metais pesados ligados a matéria orgânica, óxidos e outras frações minerais através da digestão em ácido nítrico e peróxido de hidrogênio com aquecimento por chapa elétrica. Após o processo de digestão a concentração de metais foi determinada por espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS). As análises foram realizadas pela Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental, Viamão, RS.

3.3.5 Carbono orgânico e inorgânico na água

A determinação de carbono orgânico e inorgânico presente na água foi mensurada com o uso de um analisador de combustão catalítica (VARIO TOC-CUBE, Elementar), mediante digestão da amostra a 850 °C e detecção por infravermelho (NDIR detector) com desvio

padrão de detecção de $\pm 1\%$. O volume de amostra utilizado foi de 2mL. Para determinação do carbono inorgânico total, a digestão ácida foi realizada com ácido fosfórico 1% e o suprimento de gás para combustão foi realizado com oxigênio 99,9% de pureza, com pressão de 1200 mbar e vazão de 200 mL.m⁻¹, conforme instruções do fabricante.

3.3.5.1 Carbono total no solo

A quantificação de carbono total presente no solo foi determinada com o uso de um analisador de combustão catalítica (VARIO TOC-CUBE, Elementar), mediante digestão da amostra a 950 °C e detecção por infravermelho (NDIR detector) com desvio padrão de detecção de $\pm 1\%$. Conforme instruções do fabricante foram analisadas amostras de 2 mg e o suprimento de gás foi realizado com Oxigênio 99,995% de pureza, com pressão de 1200 mbar e vazão de 200 mL.m⁻¹.

3.4 Isolamento e manutenção de microrganismos endofíticos

3.4.1 Processamento do material vegetal

As estruturas vegetais coletadas (raízes e folhas) foram enxaguadas em água corrente para remoção de poeira e solo. Em seguida ocorreu o processo de desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (ARAÚJO et al., 2001), que consistiu nas seguintes etapas: imersão em álcool etílico a 70% por 1 minuto; imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 3% (v/v) de cloro ativo por 4 minutos; imersão em álcool etílico a 70% por 30 segundos; seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada. Para análise da eficiência do processo de desinfecção alíquotas de 100 µL da última água destilada utilizada na lavagem dos tecidos vegetais foram semeados em placas de TSA 10% (*Trypcase Soy Agar*) e incubadas por até 10 dias a 28 °C.

3.4.2 Purificação das cepas

Após a desinfecção as células bacterianas endofíticas foram liberadas dos tecidos vegetais pela técnica de isolamento por trituração

(ARAÚJO et al., 2001), onde os tecidos foram cortados assepticamente em fragmentos menores e triturados em 10 mL de solução salina a 0,85% com auxílio de cadinho e pistilo. Em seguida o extrato vegetal foi transferido para tubos de 15 mL e incubados sob agitação (180 rpm) a 28°C por 1 hora. Após esse período, uma alíquota de 100 µL do extrato bruto foi semeada em meio TSA 10% e incubado por até dez dias a 28 °C. Além disso, também foram feitas diluições seriadas na ordem de 10 vezes, em tubos de ensaio contendo 9 mL de salina (0,85%). As diluições foram executadas até 10^{-3} , os tubos de salina que demonstraram crescimento microbiano foram repicados para o meio TSA 10%. Por fim, para as colônias morfologicamente diferentes foram isoladas pelo método de purificação por estrias de esgotamento.

3.4.3 Armazenamento e manutenção das cepas isoladas

Após o processo de purificação os microrganismos foram cultivados em tubos de ensaio (15 mL) contendo meio TSA inclinado e mantidos à 4 °C por até um ano. Nesse período ocorreram repiques mensais da coleção de cepas para manutenção e viabilização dos testes bioquímicos, fisiológicos e identificação dos isolados.

Posteriormente aos testes bioquímicos, fisiológicos e identificação as colônias foram crescidas em meio líquido TSB (triptose caseína de soja), transferidos para microtubos adicionando-se solução esterilizada de glicerol a 20% (v/v), sendo então armazenadas a -80 °C.

3.5 Identificação molecular das cepas isoladas

Para a identificação dos microrganismos endofíticos foram utilizadas duas técnicas, PCR de colônia ou Extração de DNA e posterior amplificação do gene 16S.

3.5.1 PCR de Colônia

A mistura de reação para PCR de colônia continha por tubo 3,5 µL de tampão concentrado 10X, 1,4 mM de $MgCl_2$, 3,5 µL de mistura de dNTP, 3,5 µL de cada iniciador 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' – LANE *et. al*, 1991; HAYASHI *et. al*, 2005) e 1492R

(5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3' - LANE *et. al*, 1991; HAYASHI *et. al*, 2005), 2,5 U de Taq polimerase e água suficiente para completar o volume da reação em 35 µL. Colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro foram recolhidas com um palito esterilizado e transferidos diretamente para os tubos de PCR como modelos de DNA. As condições de PCR foram desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1,5 minutos a 55 °C e 1 min a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C durante 3 min. A confirmação da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando como agente intercalante GelRed™ juntamente ao marcador de peso molecular lambda *HinD* III, o produto da reação foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado.

3.5.2 Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16S rRNA

Para a extração de DNA, os microrganismos foram cultivados em meio TSB líquido por 24 horas a 30 °C. Foram recolhidas alíquotas de 2 mL e centrifugadas por 5 minutos a 20000 xg. A extração foi realizada com o kit DNeasy Blood & Tissue da Qiagen, seguindo as instruções do fabricante. O gene 16S rRNA foi amplificado utilizando os iniciadores 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') e 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). A amplificação foi realizada num volume de reação de 35 µL, contendo 3,5 µL de tampão concentrado 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de mistura de dNTP, 0,1 µM de cada iniciador, 2,5 U de Taq polimerase e de 20 a 40 ng de DNA molde. As condições de PCR foram desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1,5 minutos a 55 °C e 1 min a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C durante 3 min. A confirmação da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando como agente intercalante GelRed™ (diluição 1:500) juntamente ao marcador de peso molecular Lambda *HinD* III. O produto da reação foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado.

3.5.3 Sequenciamento do gene 16S rDNA

Os produtos de amplificação 16S rRNA bacterianos foram purificados e sequenciados pela empresa MACROGEN, Seul – Coréia do

Sul, usando o sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) com BigDye Terminator Kit v3.1 (Applied Biosystems). Os iniciadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') e 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') foram usados como molde para o sequenciamento. As sequências obtidas foram editadas com o programa Vector NTI Suite 9 (pacote *ContigExpress*), a homologia foi determinada contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através de pesquisas BLASTn. Para a definição de unidades taxonômicas operacionais (OTUs – do inglês *operational taxonomic units*), foi adotado um limite de similaridade de 97%. As sequências foram alinhadas com o software MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation*), e as árvores foram construídas a partir das distâncias evolutivas pelo método vizinho juntando-se com o software de MEGA (TAMURA et al., 2011). As sequências do gene 16S rRNA obtidas foram depositadas e aceitas no NCBI GenBank, no entanto, os números de adesão ainda não foram informados.

3.6 Caracterização bioquímica e fisiológica dos microrganismos endofíticos

3.6.1 Solubilização de Fosfato Inorgânico

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico dos endofíticos foi determinada de acordo com Nautiyal (1999). Os microrganismos isolados foram inoculados em triplicata no meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate*) contendo fosfato inorgânico usando palitos estéreis, sendo incubados por 14 dias a 28 °C. A solubilização de fosfato inorgânico foi verificada pela formação de um halo claro em torno das colônias de bactérias com capacidade de solubilização de fosfato. A capacidade das bactérias em solubilizar fosfato insolúvel foi descrita pelo índice de solubilização [=diâmetro total (halo + colônia) - diâmetro da colônia]. Como controle os microrganismos foram crescidos no meio NBRIP sem adição de fosfato inorgânico.

3.6.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

O nível de resistência a metais pesados foi determinado através do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC), definido como a concentração mínima do metal capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Os microrganismos endofíticos foram inoculados em triplicata usando palitos estéreis no meio de cultura LB (*Luria-Bertani*) suplementado com os metais pesados – zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chumbo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e cádmio (CdSO_4) - em diferentes concentrações, o teste foi incubado por 7 dias a 28 °C (LODEWYCKX et al., 2002; XINXIAN et al., 2011). Placas contendo meio LB sem metais foram utilizadas como controle.

3.6.3 Fixação de Nitrogênio (amplificação por PCR dos genes *nifD*)

Para análise da fixação de nitrogênio atmosférico foi verificado a presença de um dos genes responsáveis pela enzima nitrogenase, o gene *nifD* (subunidade α). As sequências dos iniciadores utilizados para amplificação deste gene foram, 5' TGCACCTTCACCTCGGATTTCAGG 3' e 3' CCTTGATGCTGTCGTCGAACAGAGC 5'. As reações de amplificação foram realizadas num volume total de 35 μL . A mistura de reação continha 3,0 μL de tampão concentrado 10X, 3,75 μL de mistura de dNTP, 4,2 μL de cada iniciador, 3,0 U de Taq polimerase, 1,5 μL de cloreto de magnésio (MgCl_2), 30 ng de DNA molde e água ultra pura suficiente para completar o volume da reação. Os procedimentos de PCR foram desnaturação a 94 °C durante 4 min, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 62 °C durante 1 minuto, e 72 °C durante 1 minuto e 15 segundos, com uma extensão final a 72 °C durante 10 min. A confirmação da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando como agente intercalante GelRed™ juntamente ao marcador de peso molecular LowRanger DNA Ladder, o produto da reação foi visualizado sob luz UV e fotodocumentado.

Para esse ensaio foram utilizados apenas os organismos que tiveram seu material genômico extraído (códigos LAMA 1088, LAMA 1105, LAMA 1111, LAMA 1112, LAMA 1128, LAMA 1140, LAMA 1141, LAMA 1142, LAMA 1145, LAMA 1146, LAMA 1153, LAMA 1164, LAMA

1166, LAMA 1167, LAMA 1168, LAMA 1169, LAMA 1170, LAMA 1171, LAMA 1172, LAMA 1173, LAMA 1174, LAMA 1175, LAMA 1176, LAMA 1177, LAMA 1178, LAMA 1179, LAMA 1180, LAMA 1181, LAMA 1182, LAMA 1183, LAMA 1184 e LAMA 1185.

3.7 Tratamento de dados

Para enumeração das bactérias endofíticas foi utilizada a técnica de diluição à extinção ou número mais provável (NMP). A densidade bacteriana foi calculada a partir da combinação de tubos positivos para o crescimento microbiano (APHA, 2005), normalizados através de fator de correção (em virtude da diluição no extrato bruto) e assim, expressos em NMP. g⁻¹.

As árvores filogenéticas para os microrganismos identificados em Siderópolis e Florianópolis foram montadas através do método Neighborhood Joining. A robustez da filogenia foi testada pela análise de bootstrap com 1000 réplicas. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método p-distância e estão em unidades de número de diferenças de bases. As análises evolutivas foram realizadas no software MEGA 6.4 (TAMURA et al., 2011).

Adicionalmente foram realizadas algumas análises multivariadas exploratórias (análise de componentes principais) para averiguar relações entre os isolados e as espécies de plantas e respectivos tecidos e locais onde foram coletados.

4 RESULTADOS

4.1 *Análise dos dados físico-químicos das matrizes ambientais*

Os parâmetros físico-químicos da água como o pH, temperatura e condutividade elétrica, além da temperatura do ar foram analisados no dia da coleta, e estão apresentados na Tabela 2. Em Siderópolis os baixos valores de pH registrados foram decorrentes da dissolução de ácido sulfúrico, ocasionados principalmente pelos processos de oxidação da pirita (Fe_2S), enquanto o pH dos locais amostrados em Florianópolis é ligeiramente ácido devido a acidificação natural ocasionado pela presença de turfas. Os valores elevados de condutividade em Siderópolis indicam a forte dissolução de íons na drenagem de minas.

Tabela 2: Dados referentes os parâmetros físico-químicos determinados durante as coletas realizadas em Siderópolis e Florianópolis, SC durante os meses de junho de 2012 e abril de 2013.

Parâmetros físico-químicos <i>in-situ</i>					
Local	Coleta	pH	Temperatura da Água (°C)	Temperatura do Ar (°C)	Condutividade (mS/cm ²)
Siderópolis	Inverno 07.07.2012	3,5	21,5	15,0	5,66
	Primavera 09.12.2102	3,0	29,0	34,0	3,99
Florianópolis	Primavera 08.10.2012	5,0	26,0	27,0	0,38
	Outono 06.04.2013	5,0	25,0	28,5	0,41

Em Florianópolis, os teores de carbono nas amostras de água foram maiores (Tabela 3), devido em parte a presença marcante de *Sphagnum* sp. e *Eleocharis* sp., conforme observados na figura 4, que ocasionam retenção de água, possibilitando a formação do solo hidromórfico com forte cheiro de metano, ocasionado pela decomposição de matéria orgânica, o que consequentemente leva ao aporte de carbono à matriz ambiental.

Tabela 3: Valores médios (mg.L⁻¹ ± desvio padrão (n=3)) de carbono inorgânico total (CIT), carbono orgânico total (COT) e carbono total (CT) de amostras de água de Siderópolis e Florianópolis, SC.

Local	CIT	COT	CT
Siderópolis	0,179 ± 0,05	2,564 ± 0,10	2,743 ± 0,07
Florianópolis	0,722 ± 0,03	3,449 ± 0,17	4,171 ± 0,14



Figura 4: Imagem dos pontos de coleta de água em Siderópolis (A) e Florianópolis (B), SC, (Imagem: do autor).

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros físico-químicos determinados nos solos amostrados. Verifica-se a existência de fósforo disponível nos solos avaliados, com exceção do ponto 1 e sedimento de Florianópolis, tendo o sedimento de Siderópolis o maior valor de fósforo, enquanto que no ponto 2 de Florianópolis foi observada a menor disponibilidade de fósforo.

Os pontos 1 e 2 de Siderópolis apresentaram valores baixos para disponibilidade de nitrogênio total, enquanto os outros pontos apresentaram maiores valores (Tabela 4). Os teores de carbono total alcançaram seus maiores valores em Florianópolis no ponto 1 e sedimento, já o menor valor ocorreu em Siderópolis na amostra de sedimento (Tabela 4).

Todos os solos apresentaram um pH inferior a 4,16 sendo o solo de Siderópolis ponto 2 o mais ácido (2,51). O pH do solo é um dos fatores que influencia fortemente a biodisponibilidade e toxicidade dos metais pesados, contribuindo para sua solubilização e especiação (ALLOWAY, 1995). Em pH ácido, os metais existem em sua forma livre, na forma de íons. Desse modo, possuindo maior mobilidade e ficam mais disponíveis para serem absorvidos pelas plantas e microrganismos (CHAUDRI et al., 2000).

Tabela 4: Valores médios \pm desvio padrão (n=3) de pH, fósforo disponível, nitrogênio total e carbono total de amostra de solos oriundos de Siderópolis e Florianópolis, SC.

Local	Amostra	pH	Fósforo (mg.kg ⁻¹)	Nitrogênio (g.kg ⁻¹)	Carbono (%)
Siderópolis	Ponto 1	2,76 \pm 0,02	0,16 \pm 0,04	0,14 \pm 0,01	3,36 \pm 0,18
	Ponto 2	2,51 \pm 0,05	1,18 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01	11,93 \pm 1,37
	Ponto 3	3,34 \pm 0,07	4,88 \pm 0,05	42,46 \pm 0,01	6,74 \pm 0,64
	Sedimento	3,15 \pm 0,01	6,18 \pm 0,22	59,26 \pm 0,05	1,03 \pm 0,27
Florianópolis	Ponto 1	4,16 \pm 0,01	ND	84,08 \pm 0,00	38,52 \pm 0,01
	Ponto 2	2,53 \pm 0,07	0,26 \pm 0,03	70,36 \pm 0,02	6,58 \pm 2,68
	Sedimento	4,16 \pm 0,04	ND	ND	41,16 \pm 17,41

ND= valor não determinado

Em relação à análise de metais feita para as amostras de água, foi observada que a concentração de níquel ultrapassou cerca de 15 vezes o limite máximo permitido desse metal para água doce (Classe 2) de acordo com a Resolução Conama 357, enquanto que os metais manganês e zinco ultrapassaram aproximadamente 200 vezes o limite para água analisada em Siderópolis (Tabela 5). Os valores das concentrações de todos os metais testados na água de Florianópolis satisfizeram os limites permitidos (Tabela 5).

Ainda, a análise de metais nas matrizes ambientais revelou altos índices de chumbo nas amostras de solo (ponto 1, 2 e 3), como também de zinco em amostras de solo (ponto 1, 2 e 3), sedimento e água no município de Siderópolis (Tabela 5). Os valores registrados para ferro demonstraram elevada concentração em ambos os locais estudados. Em Florianópolis, foram verificados altos teores de manganês e zinco para o solo e o sedimento, quando comparados aos outros elementos (Tabela 6).

As concentrações totais de metais pesados avaliados nos diferentes solos amostrados variaram, conforme os dados presentes na Tabela 6. A amostra de solo no ponto 2 de Florianópolis foi a que apresentou a menor concentração de metais pesados. Cádmio não foi detectado em nenhum dos solos avaliados, enquanto ferro apresentou a maior concentração em todos os solos. Os metais manganês, chumbo e zinco ocorreram nos dois locais estudados. No município de

Siderópolis foram detectadas as maiores concentrações de manganês (Ponto 3 - 181,0 mg.kg⁻¹), chumbo (Ponto 2 - 109,0 mg.kg⁻¹) e zinco (Ponto 1 - 66, 5 mg.kg⁻¹).

Tabela 5: Concentração total de metais pesados (mg.L⁻¹) nas amostras de água de Siderópolis e Florianópolis, SC.

Metais (mg.kg⁻¹)	Siderópolis	Florianópolis	VMP*
Cd	<0,001	<0,001	0,001
Cu	<0,005	<0,005	-
Fe	140,8	<0,120	-
Mn	20,1	<0,01	0,1
Ni	0,371	<0,02	0,025
Pb	<0,008	<0,008	0,01
Zn	36,02	<0,116	0,18

* Valores máximos (mg.L⁻¹) de metais pesados permitidos pela Resolução Conama 357/2005 – Água doce.

Tabela 6: Concentração total de metais pesados (mg.kg^{-1}) nas amostras de solo de Siderópolis e Florianópolis, SC.

Metais (mg.kg^{-1})	Siderópolis				Florianópolis			VP*
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Sedimento	Ponto 1	Ponto 2	Sedimento	
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,3
Cu	ND	8,0	5,2	ND	ND	ND	13,9	600,0
Fe	>20000,0	18386,0	17019,0	>20000,0	5520,0	698,0	23823,0	-
Mn	ND	15,5	181,0	ND	14,0	2,9	5,7	-
Ni	ND	ND	ND	2,7	ND	ND	5,5	30,0
Pb	58,60	109,00	25,40	6,00	15,60	ND	7,90	72,0
Zn	66,5	5,7	11,3	120	9,7	11,8	14,6	300,0

ND= valor inferior ao limite de detecção. * Valores de prevenção (mg.kg^{-1}) de metais pesados pela Resolução Conama 420/2009.

4.2 Avaliação da Comunidade Bacteriana Endofítica Cultivável

Por meio da análise da frequência de tubos positivos verificados na série de diluição, foi possível determinar a densidade de microrganismos endofíticos presente nos tecidos (raízes e folhas) das espécies vegetais.

A densidade total da população endofítica em Siderópolis variou entre 10^1 a 10^3 NMP/g (Figura 5), já para Florianópolis variou entre 10^1 a 10^2 (Figura 6).

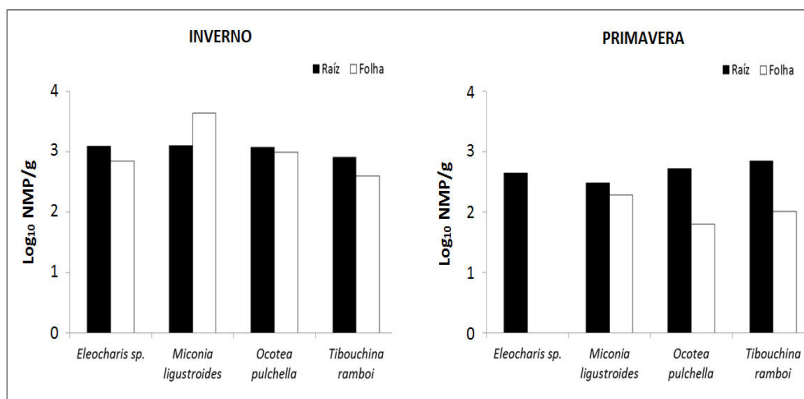


Figura 5: Densidade total (NMP.g⁻¹) da comunidade bacteriana presente nos tecidos de *Eleocharis sp.*, *Miconia ligustroides*, *Ocotea pulchella* e *Tibouchina ramboi* no isolamento realizado durante o período de inverno e primavera de 2012 em Siderópolis, SC.

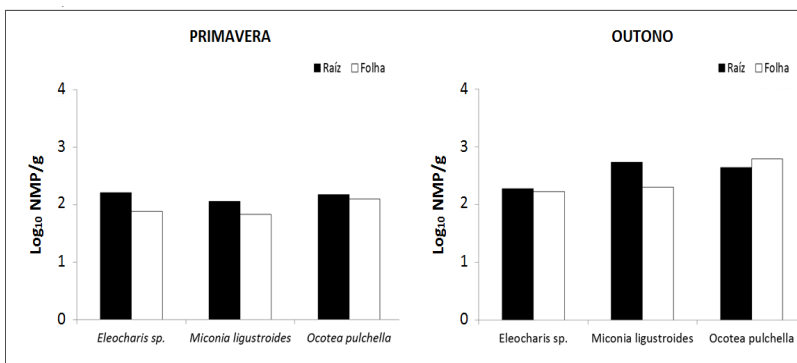


Figura 6: Densidade total (NMP.g⁻¹) da comunidade bacteriana presentes nos tecidos de *Eleocharis sp.*, *Miconia ligustroides* e *Ocotea pulchella* em isolamento realizado durante o período de primavera de 2012 e outono de 2013 em Florianópolis, SC.

4.3 Isolamento dos Microrganismos Endofíticos

Foram isolados 192 microrganismos endofíticos, sendo 114 bactérias e 78 fungos. Para o presente estudo foram avaliadas apenas as bactérias endofíticas. Do total de bactérias isoladas, 54 foram provenientes dos tecidos das 4 diferentes espécies vegetais de

Siderópolis, enquanto que em Florianópolis foram obtidos 60 isolados de 3 diferentes espécies vegetais. Embora a densidade da comunidade endofítica (Figuras 4 e 5) seja maior no município de Siderópolis, a quantidade total de cepas isoladas foi maior em Florianópolis (52,6%), fato este esperado em virtude do elevado grau de contaminação por metais pesados no município de Siderópolis (Figura 7).

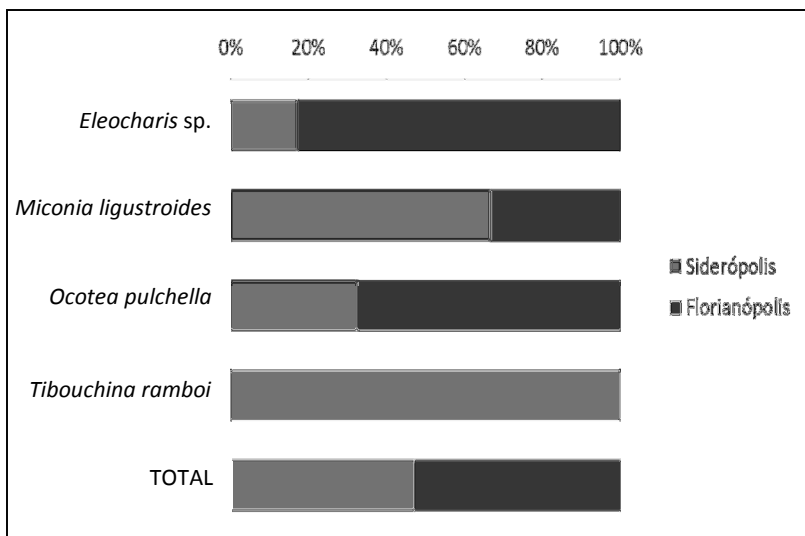


Figura 7: Percentual de microrganismos endofíticos isolados a partir de tecidos vegetais originários de plantas coletadas em Siderópolis e Florianópolis.

A quantidade de cepas isoladas dos tecidos vegetais de *Eleocharis sp.* e *Ocotea pulchella* (Figura 6 e Anexo A) foram maiores nas amostras de Florianópolis, enquanto, em Siderópolis ocorreu uma maior quantidade de estirpes isoladas a partir de *Miconia ligustroides*.

Em relação ao percentual de espécies isoladas nos diferentes tecidos vegetais, observou-se que na primavera ocorreu a menor quantidade de cepas isoladas tanto em Florianópolis (23 cepas isoladas na primavera contra 37 no outono) quanto em Siderópolis (33 cepas isoladas no inverno contra 21 cepas na primavera) (Figura 8, Anexo A). Apesar da maior frequência de cepas isoladas ocorrer em Siderópolis no inverno, o número de isolados obtidos a partir de *Eleocharis* sp. foi maior na primavera (1 cepa isolado no inverno e 4 na primavera). Estirpes isolados de *Miconia ligustroides* em Florianópolis foram encontradas apenas no outono. A colonização das raízes nas espécies estudadas foi maior que em folhas para ambos os locais – 41 cepas purificadas em Siderópolis e 44 cepas purificadas em Florianópolis (Figura 8, Anexo A).

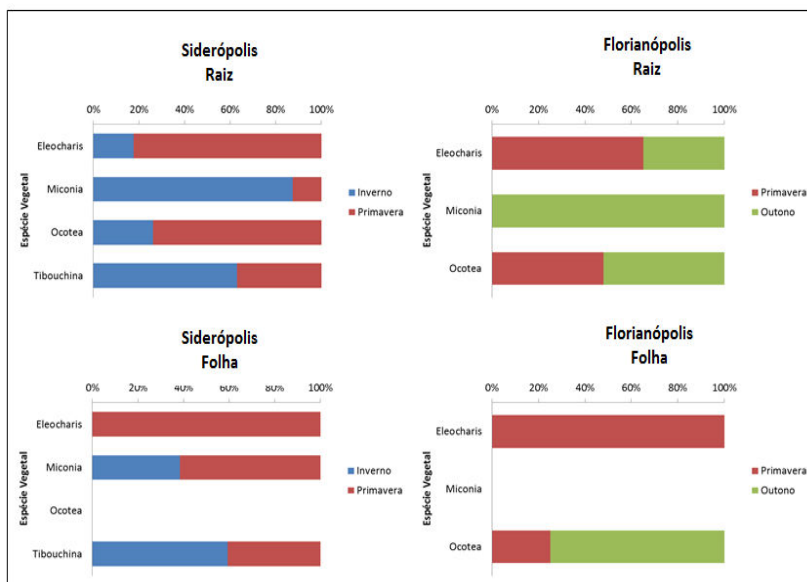


Figura 8: Distribuição percentual de isolados por tipo de tecido vegetal coletado nas amostras de Siderópolis/SC e Florianópolis/SC, em diferentes estações do ano.

4.4 Identificação Molecular

Isolados em Siderópolis:

Por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foram identificados 94 microrganismos. Dentre esses, quarenta e quatro microrganismos foram provenientes de Siderópolis, pertencentes a seis classes filogenéticas, a saber: Acidobacteriales, Actinobacteridae, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria (Figura 8). A maior diversidade de cepas isoladas pertence à classe Bacilli (30 cepas), não sendo isolados microrganismos desta classe apenas em *Ocotea pulchella* na coleta da primavera. Apenas uma cepa pertence à Acidobacteriales, sendo isolada a partir da raiz de *Ocotea pulchella*. Microrganismos da classe Alphaproteobacteria foram isolados apenas em *Ocotea pulchella* e *Tibouchina ramboi*. O único endofítico da classe Gammaproteobacteria foi isolado em *Miconia ligustroides*, a partir de suas folhas. Das quarenta e quatro cepas identificadas em Siderópolis, podemos verificar através da tabela 7 a formação de 31 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Dessas, o isolado LAMA 1120 pode representar nova espécie, uma vez que sua sequência apresentou índice de similaridade inferior a 97% quando comparado ao banco de dados. Esse organismo foi considerado pertencente ao gênero *Paenibacillus*.

As classes Acidobacteriales, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria apresentaram apenas uma OTU cada, sendo representados pelas espécies *Terriglobus roseus* (n= 1), *Burkholderia tropica* (n= 2) e *Serratia marcescens* (n= 1), respectivamente.

Na classe Bacilli foram agrupadas dezenove OTUs, doze pertencentes ao gênero *Bacillus* (n= 20), gênero com a maior representatividade para Siderópolis, uma OTU para o gênero *Brevibacillus* (n= 2) e uma para *Brevibacterium* (n= 2) e cinco identificadas no gênero *Paenibacillus* (n= 6). Na classe Alphaproteobacteria foram encontradas seis OTUs, sendo uma relacionada ao gênero *Bradyrhizobium* (n= 1), dois a *Mesorhizobium* (n= 3), dois a *Methylobacterium* (n= 2) e um a *Paracoccus* (n= 1). Para a última classe Actinobacteridae, encontramos três OTUs, sendo uma pertencente ao gênero *Micrococcus* (n= 1) e as outras duas a *Streptomyces* (n= 2). De forma geral, encontramos o número de OTUs gerado próximo ao número de organismos isolados para Siderópolis,

pois das 31 OTUs obtidas, vinte e duas eram representadas por apenas um microrganismo isolado, enquanto que as demais nove OTUs apresentaram pelo menos duas cepas isoladas. Dentre essas nove OTUs, para espécie *Bacillus cereus* (OTU número quinze) foi encontrada o maior número de cepas isoladas, cinco ao total.

No total de unidades taxonômicas operacionais encontradas, duas eram de endofíticos prospectados a partir de *Eleocharis* sp. (OTUs números 21 e 24). Em *Miconia ligustroides* encontramos o maior número de OTUs, dez (números 3, 4, 13, 17, 18, 19, 26, 28, 29 e 31). Para *Ocotea pulchella* ocorreram oito OTUs (números 1, 2, 6, 7, 8, 10, 16 e 30) e para *Tibouchina ramboi* foram identificados sete OTUs (número 5, 9, 11, 20, 22, 25 e 27). Alguns isolados foram encontrados em mais de uma espécie vegetal, como a OTU número doze, comum a *Eleocharis* e *Ocotea*. Já a OTU quinze foi frequente em *Eleocharis*, *Miconia* e *Ocotea*. Por fim, as OTUs quatorze e vinte e três foram comuns em *Ocotea* e *Tibouchina*.

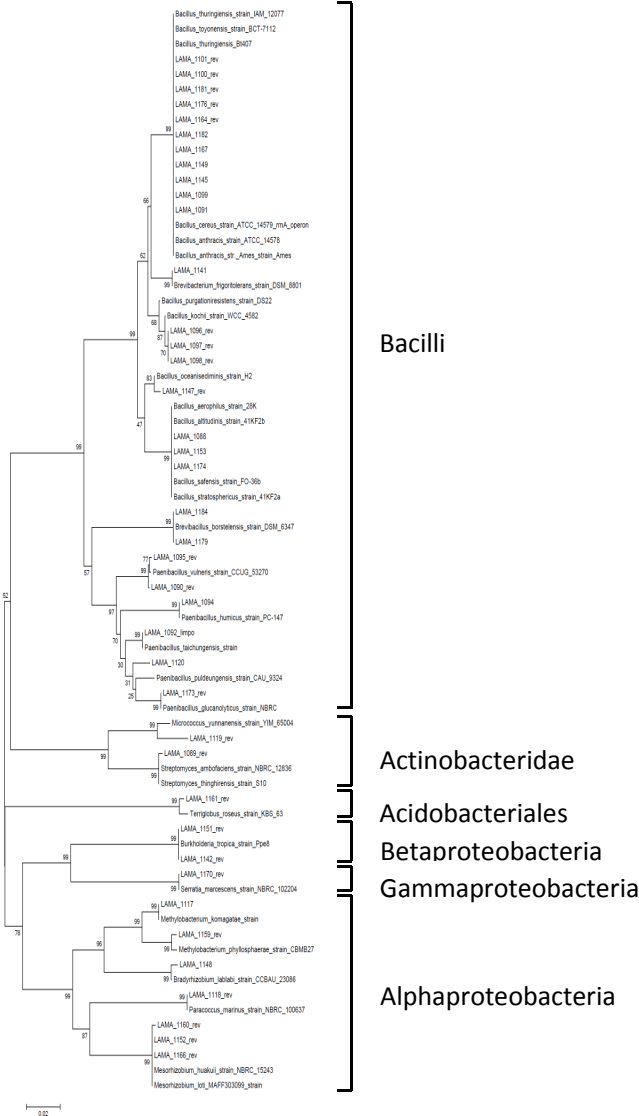


Figura 9: Relações filogenéticas baseadas em sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir de bactérias endofíticas associadas com tecidos de *Eleocharis* sp., *Miconia ligustroides*, *Ocotea pulchella* e *Tibouchina ramboi* de amostras oriundas de Siderópolis e sequências de referência recuperadas do GenBank. Valores de bootstrap (n=1000) são indicados no nó.

Tabela 7: Identificação, origem de isolamento, porcentagem de similaridade e número de cepas para cada unidade taxonômica operacional (OTU) identificadas no município de Siderópolis/SC.

CLASSE	OTU	Identificação da cepa	Origem	Similaridade	Código da Cepa	Nº isolados	Coleta
Acidobacteriales	1	<i>Terriglobus roseus</i> strain KBS 63	<i>Ocotea pulchella</i>	98%	LAMA 1161	1	Primavera
Actinobacteridae	2	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004	<i>Ocotea pulchella</i>	98%	LAMA 1119	1	Primavera
	3	<i>Streptomyces ambofaciens</i> strain NBRC 12836	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1089	1	Inverno
	4	<i>Streptomyces thinghirensis</i> strain S10	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1093	1	Inverno
Alphaproteobacteria	5	<i>Bradyrhizobium lablabi</i> strain CCBAU 23086	<i>Tibouchina ramboi</i>	99%	LAMA 1148	1	Inverno
	6	<i>Mesorhizobium huakuii</i> strain NBRC 15243	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1160	1	Primavera
	7	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1166; LAMA 1152	2	Primavera
	8	<i>Methylobacterium komagatae</i> strain 002-079	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1117	1	Primavera
	9	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> strain CBMB27	<i>Tibouchina ramboi</i>	99%	LAMA 1159	1	Primavera
	10	<i>Paracoccus marinus</i> strain NBRC 100637	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1118	1	Primavera
Bacilli	11	<i>Bacillus aerophilus</i> strain 28K; <i>Bacillus altitudinis</i> strain 41KF2b	<i>Tibouchina ramboi</i>	99%	LAMA 1174	1	Primavera

Continuação tabela 7.

CLASSE	OTU	Identificação da cepa	Origem	Similaridade	Código da Cepa	Nº isolados	Coleta
	12	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain; <i>Bacillus anthracis</i> strain ATCC 14578	<i>Ocotea pulchella</i> e <i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1145; LAMA 1182	2	Inverno e Primavera
	13	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain; <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	<i>Miconia ligustroides</i>	100%	LAMA 1164	1	Primavera
	14	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain; <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	<i>Ocotea pulchella</i> e <i>Tibouchina ramboi</i>	99 - 100%	LAMA 1146; LAMA 1185; LAMA 1181	3	Inverno
	15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 strain ATCC 14579	<i>Miconia ligustroides</i> , <i>Tibouchina ramboi</i> e <i>Eleocharis</i> sp.	99 - 100%	LAMA 1091; LAMA 1100; LAMA 1101; LAMA 1149; LAMA 1176	5	Inverno e Primavera
	16	<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579 rrnA operon; <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407; <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1167	1	Inverno
	17	<i>Bacillus kochii</i> strain WCC 4582	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1096; LAMA 1098	2	Inverno
	18	<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1147	1	Inverno
	19	<i>Bacillus purgationiresistens</i> strain DS22	<i>Miconia ligustroides</i>	97%	LAMA 1097	1	Inverno
	20	<i>Bacillus safensis</i> strain FO-36b	<i>Tibouchina ramboi</i>	100%	LAMA 1153	1	Primavera

Continuação tabela 7.

CLASSE	OTU	Identificação da cepa	Origem	Similaridade	Código da Cepa	Nº isolados	Coleta
Bacilli	21	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a	<i>Eleocharis</i> sp.	100%	LAMA 1088	1	Inverno
	22	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	<i>Tibouchina ramboi</i>	100%	LAMA 1099	1	Inverno
	23	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain DSM 6347	<i>Ocotea pulchella</i> e <i>Tibouchina ramboi</i>	99 - 100%	LAMA 1184; LAMA 1179	2	Inverno e Primavera
	24	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> strain DSM 8801	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1165; LAMA 1141	2	Primavera
	25	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> strain NBRC 15330	<i>Tibouchina ramboi</i>	99%	LAMA 1173	1	Primavera
	26	<i>Paenibacillus humicus</i> strain PC-147	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1094	1	Inverno
	27	<i>Paenibacillus puldeungensis</i> strain CAU 9324	<i>Tibouchina ramboi</i>	96%	LAMA 1120	1	Primavera
	28	<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1092	1	Inverno
	29	<i>Paenibacillus vulneris</i> strain CCUG 53270	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1090; LAMA 1095	2	Inverno
Betaproteobacteria	30	<i>Burkholderia tropica</i> strain Ppe8	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1142; LAMA 1151	2	Primavera
Gammaproteobacteria	31	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>Marcescens</i>	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1170	1	Primavera

Isolados em Florianópolis:

Os cinquenta endofíticos identificados através da análise do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA em Florianópolis foram relacionados a cinco classes filogenéticas: Actinobacteridae, Alphaproteobacteria, Bacilli, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria (Figura 10). Da mesma forma como em Siderópolis a classe Bacilli foi a mais representativa para os tecidos vegetais estudados, apresentando 29 estirpes, sendo isolados 13 na primavera e 16 no outono. As cepas isoladas das classes Bacilli e Gammaproteobacteria foram encontradas para as três plantas estudadas para Florianópolis. O único endofítico representante da classe Actinobacteridae foi obtido a partir de folhas de *Ocotea pulchella* na coleta de outono. Todas as cinco cepas oriundas da classe Alphaproteobacteria foram também isoladas de *Ocotea pulchella* a partir da amostra coletada no outono. Betaproteobacteria apresentou 9 estirpes isoladas, sendo sete de *Eleocharis* sp. e duas de *Miconia ligustroides*.

A partir do sequenciamento e identificação foi possível observar a formação de 34 OTUs formadas pelos endofíticos isolados a partir das amostras vegetais coletadas em Florianópolis (Tabela 8), sendo este número superior ao isolado em Siderópolis, principalmente ao considerarmos o isolamento de microrganismos de três diferentes espécies vegetais e não de quatro como ocorreu em Siderópolis. A análise das sequências parciais (16S rRNA) dos isolados LAMA 1124 e LAMA 1125 apresentou índice de similaridade inferior a 97%, podendo assim, representarem novas espécies. Esses microrganismos foram designados ao gênero *Paenibacillus*.

A classe Actinobacteridae apresentou uma única OTU, sendo representada pela espécie *Curtobacterium oceanosedimentum*.

A classe Alphaproteobacteria foi representada por três OTUs, duas para o gênero *Methylobacterium* (n=3) e uma para *Rhizobium* (n=2). Bacilli, a classe de maior representatividade, formou vinte OTUs, onze pertencentes ao gênero *Bacillus* (n= 18), quatro OTUs a *Paenibacillus* (n= 5), duas OTUs a *Lysinibacillus* (n= 3) e para *Brevibacillus* (n= 1), *Cohnella* (n=1) e *Tumebacillus* (n=1) apenas uma OTU cada.

As classes Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria apresentam cinco OTUs cada. Para Betaproteobacteria foram isoladas três OTUs para o gênero *Herbaspirillum* (n= 6), uma OTU para *Burkholderia* (n= 2) e também uma para *Silvimonas* (n= 1). Já na classe Gammaproteobacteria ocorreram duas OTUs para o gênero *Pantoea* (n=2), *Klebsiella* (n= 1), *Pseudomonas* (n= 2) e *Raoultella* (n= 1) apenas uma OTU para cada.

Também para Florianópolis foi observado um número de OTUs próximo ao total de organismos isolados, pois das 34 OTUs obtidas, 22 apresentavam uma única cepa isolada e as outras doze duas ou mais.

Ocotea pulchella apresentou o maior número de OTUs, ao todo foram quatorze (OTUs número 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 25 e 33). Em seguida *Eleocharis* sp., com treze OTUs (números 6, 8, 9, 16, 20, 21, 22, 26, 27, 28, 29, 31 e 32) e *Miconia* apresentando quatro OTUs (números 23, 25, 30 e 34). Algumas OTUs foram comuns a mais de uma espécie vegetal, as OTUs de número 7e 14 ocorreram em *Eleocharis* e *Ocotea*, enquanto a OTU número doze ocorreu em *Eleocharis* e *Miconia* (Tabela 8).

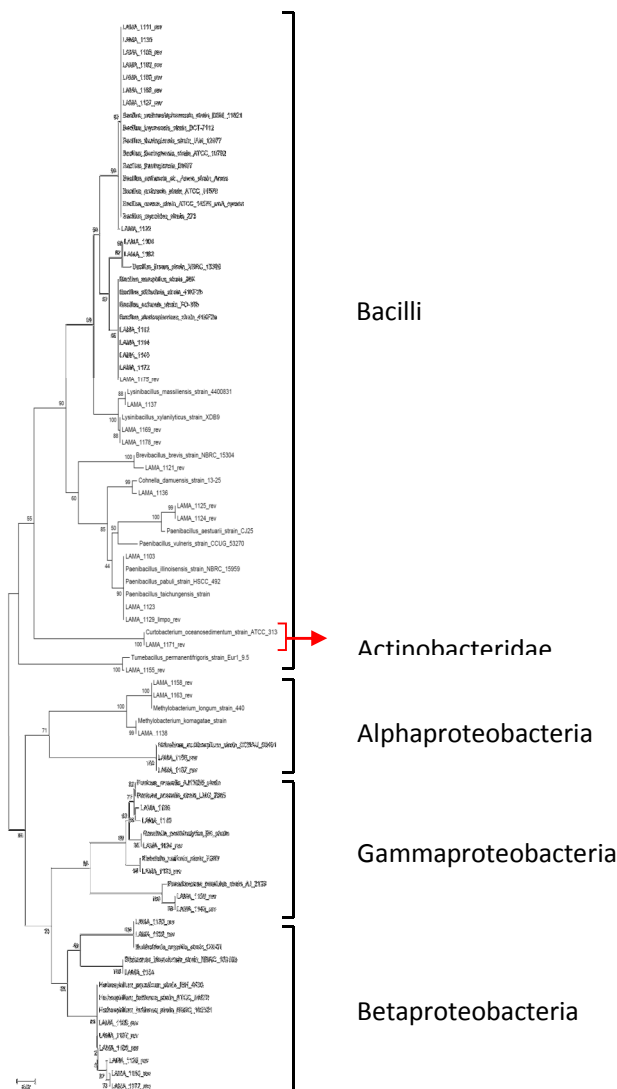


Figura 10: Relações filogenéticas baseadas em sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas a partir de bactérias endofíticas associadas aos tecidos de *Eleocharis* sp., *Miconia ligustroides* e *Ocotea pulchella* de amostras oriundas de Florianópolis e sequências de referência recuperadas do GenBank. Valores de bootstrap (n=1000) são indicados no nó.

Tabela 8: Identificação, origem de isolamento, porcentagem de similaridade e número de cepas para cada unidade taxonômica operacional (OTU) identificadas em Florianópolis/SC.

CLASSE	OTU	Identificação da cepa	Origem	Similaridade	Código da Cepa	Nº isolados	Coleta
Actinobacteridae	1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> strain ATCC 31317	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1171	1	Outono
Alphaproteobacteria	2	<i>Methylobacterium komagatae</i> strain 002-079	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1138	1	Outono
	3	<i>Methylobacterium longum</i> strain 440	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1158; LAMA 1163	2	Outono
	4	<i>Rhizobium multihospitium</i> strain CCBAU 83401	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1156; LAMA 1157	2	Outono
Bacilli	5	<i>Bacillus aerophilus</i> strain 28K; <i>Bacillus altitudinis</i> strain 41KF2b; <i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1172; LAMA 1114; LAMA 1140; LAMA 1175	4	Primavera e Outono
	6	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain Ames; <i>Bacillus anthracis</i> strain ATCC 14578	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1105	1	Primavera
	7	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain Ames; <i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579 rrnA operon	<i>Eleocharis</i> sp. e <i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1180; LAMA 1183	2	Primavera e Outono
	8	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 strain ATCC 14579	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1122	1	Outono
	9	<i>Bacillus firmus</i> strain NBRC 15306	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1104; LAMA 1162	2	Primavera

Continuação Tabela 8.

CLASSE	OTU	Identificação da cepa	Origem	Similaridade	Código da Cepa	Nº isolados	Coleta
Bacilli	10	<i>Bacillus mycoides</i> strain 273; <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407; <i>Bacillus weihenstephanensis</i> strain DSM 11821	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1168	1	Primavera
	11	<i>Bacillus safensis</i> strain FO-36b	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1112	1	Primavera
	12	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	<i>Eleocharis</i> sp. e <i>Miconia ligustroides</i>	99 - 100%	LAMA 1126; LAMA 1131	2	Outono
	13	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1135	1	Outono
	14	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792; <i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077; <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	<i>Eleocharis</i> sp. e <i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1113; LAMA 1127	2	Primavera e Outono
	15	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792; <i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	<i>Ocotea pulchella</i>	100%	LAMA 1111	1	Primavera
	16	<i>Brevibacillus brevis</i> strain NBRC 15304	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1121	1	Outono
	17	<i>Cohnella damuensis</i> strain 13-25	<i>Ocotea pulchella</i>	98%	LAMA 1136	1	Outono
	18	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> strain XDB9	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1178; LAMA 1169	2	Primavera
	19	<i>Lysinibacillus massiliensis</i> strain 4400831	<i>Ocotea pulchella</i>	97%	LAMA 1137	1	Outono

Continuação Tabela 8.

CLASSE	OTU	Identificação da cepa	Origem	Similaridade	Código da Cepa	Nº isolados	Coleta
Bacilli	20	<i>Paenibacillus aestuarii</i> strain CJ25	<i>Eleocharis</i> sp.	96%	LAMA 1124; LAMA 1125	2	Outono
	21	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1103	1	Primavera
	22	<i>Paenibacillus pabuli</i> strain HSCC 492	<i>Eleocharis</i> sp.	100%	LAMA 1123	1	Outono
	23	<i>Paenibacillus pabuli</i> strain HSCC 492T (NRRL NRS-924T); <i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1129	1	Outono
	24	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1155	1	Outono
Betaproteo- bacteria	25	<i>Burkholderia oxyphila</i> strain OX-01	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1130; LAMA 1132	2	Outono
	26	<i>Herbaspirillum aquaticum</i> strain	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1150; LAMA 1128	2	Primavera e Outono
	27	<i>Herbaspirillum huttiense</i> strain ATCC 14670	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1107; LAMA 1109; LAMA 1177	3	Primavera
	28	<i>Herbaspirillum huttiense</i> strain ATCC 14670; <i>Herbaspirillum huttiense</i> strain NBRC 102521	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1106	1	Primavera
	29	<i>Silvimonas iriomotensis</i> strain NBRC 103188	<i>Eleocharis</i> sp.	98%	LAMA 1154	1	Outono

Continuação Tabela 8.

Gammaproteo-bacteria	30	<i>Klebsiella variicola</i> strain F2R9	<i>Miconia ligustroides</i>	99%	LAMA 1133	1	Outono
	31	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 strain AJ13355	<i>Eleocharis</i> sp.	98%	LAMA 1108	1	Primavera
	32	<i>Pantoea ananatis</i> strain LMG 2665	<i>Eleocharis</i> sp.	99%	LAMA 1110	1	Primavera
	33	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> strain NBRC 16634; <i>Pseudomonas parafulva</i> strain AJ 2129	<i>Ocotea pulchella</i>	99%	LAMA 1139; LAMA 1143	2	Outono
	34	<i>Raoultella ornithinolytica</i> B6 strain B6	<i>Miconia ligustroides</i>	100%	LAMA 1134	1	Outono

4.5 Caracterização Bioquímica e Fisiológica

Durante o processo de manutenção e identificação, algumas cepas foram perdidas, devido à dificuldade de reproduzir em laboratório as condições ambientais onde esses microrganismos vivem, sendo assim, 95 endofíticos foram caracterizados bioquímica e fisiologicamente. Dos 95 microrganismos avaliados, 45 são provenientes do isolamento de Siderópolis e 50 de Florianópolis.

Para estabelecer o perfil de resistência numa mesma condição de cultivo, foi avaliada a concentração mínima inibitória dos microrganismos isolados frente a diferentes metais pesados, como também foi determinada a capacidade dos endofíticos em solubilizar fosfato insolúvel no meio. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) a Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} e a capacidade de solubilização de fosfato pelas bactérias endofíticas.

Código do Isolado	Resistência Metal Pesado			Solubilização de Fosfato	Identificação da Cepa (16S rRNA)	
	MIC Zn ⁺² (mM)	MIC Pb ⁺² (mM)	MIC Cd ⁺² (mM)	Índice de Solubilização (cm)		
LAMA 1088	10,0	8,0	> 4,0	1,023 ±	0,163	<i>Bacillus stratosphericus</i>
LAMA 1089	2,5	8,0	0,5	0,523 ±	0,244	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
LAMA 1090	2,5	8,0	0,5	0,890 ±	0,075	<i>Paenibacillus vulneris</i>
LAMA 1091	20,0	16,0	4,0	0,550 ±	0,046	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA 1092	2,5	8,0	0,5	1,223 ±	0,383	<i>Paenibacillus taichungensis</i>
LAMA 1093	2,5	4,0	0,5	0,443 ±	0,047	<i>Streptomyces thinghirensis</i>
LAMA 1094	ND	ND	ND	ND		<i>Paenibacillus humicus</i>
LAMA 1095	2,5	8,0	0,5	1,017 ±	0,055	<i>Paenibacillus vulneris</i>
LAMA 1096	0,5	4,0	0,5	ND		<i>Bacillus kochii</i>
LAMA 1097	2,5	4,0	0,5	ND		<i>Bacillus purgationiresistens</i>
LAMA 1098	5,0	4,0	0,5	ND		<i>Bacillus kochii</i>
LAMA 1147	0,5	4,0	4,0	0,293 ±	0,099	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
LAMA 1145	> 20,0	> 16,0	2,0	ND		<i>Bacillus anthracis</i>
LAMA 1167	> 20,0	16,0	4,0	ND		<i>Bacillus thuringiensis</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus toyonensis</i>
LAMA 1184	> 20,0	16,0	> 4,0	ND		<i>Brevibacillus borstelensis</i>
LAMA 1146	> 20,0	> 16,0	> 4,0	ND		<i>Bacillus anthracis</i> ; <i>Bacillus cereus</i>

Continuação Tabela 9.

Código do Isolado	Resistência Metal Pesado			Solubilização de Fosfato	Identificação da Cepa (16S rRNA)
	MIC Zn ⁺² (mM)	MIC Pb ⁺² (mM)	MIC Cd ⁺² (mM)	Índice de Solubilização (cm)	
LAMA 1185	10,0	16,0	4,0	ND	<i>Bacillus anthracis; Bacillus cereus</i>
LAMA 1099	20,0	16,0	4,0	0,453 ± 0,163	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1100	20,0	8,0	4,0	0,737 ± 0,140	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA 1148	1,5	0,5	4,0	2,148 ± 0,839	<i>Bradyrhizobium lablabi</i>
LAMA 1149	20,0	8,0	4,0	0,630 ± 0,014	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA 1181	10,0	0,5	0,5	2,115 ± 0,686	<i>Bacillus anthracis; Bacillus cereus</i>
LAMA 1101	20,0	8,0	4,0	0,565 ± 0,177	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA 1177	2,5	0,5	4,0	0,423 ± 0,155	<i>Herbaspirillum huttiense</i>
LAMA 1103	10,0	16,0	4,0	1,217 ± 0,300	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
LAMA 1150	2,5	0,5	4,0	0,377 ± 0,316	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>
LAMA 1180	ND	ND	ND	ND	<i>Bacillus anthracis; Bacillus cereus</i>
LAMA 1104	1,5	0,5	4,0	ND	<i>Bacillus firmus</i>
LAMA 1162	1,5	0,5	4,0	0,295 ± 0,021	<i>Bacillus firmus</i>
LAMA 1105	10,0	8,0	> 4,0	0,853 ± 0,279	<i>Bacillus anthracis</i>
LAMA 1108	2,5	8,0	1,0	3,428 ± 0,067	<i>Pantoea ananatis</i>
LAMA 1109	2,5	1,0	2,0	0,127 ± 0,012	<i>Herbaspirillum huttiense</i>
LAMA 1110	2,5	8,0	1,0	3,395 ± 0,095	<i>Pantoea ananatis</i>

Continuação Tabela 9.

Código do Isolado	Resistência Metal Pesado			Solubilização de Fosfato		Identificação da Cepa (16S rRNA)	
	MIC Zn ⁺² (mM)	MIC Pb ⁺² (mM)	MIC Cd ⁺² (mM)	Índice de Solubilização (cm)			
LAMA 1111	10,0	16,0	> 4,0	0,650	± 0,014	<i>Bacillus toyonensis</i> ;	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1178	2,5	8,0	0,5		ND	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	
LAMA 1169	2,5	8,0	0,5		ND	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	
LAMA 1112	10,0	8,0	4,0	0,653	± 0,119	<i>Bacillus safensis</i>	
LAMA 1113	10,0	8,0	4,0	1,110	± 0,035	<i>Bacillus toyonensis</i> ;	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1168	10,0	> 16,0	4,0	0,937	± 0,119	<i>Bacillus mycoides</i> ; <i>Bacillus thuringiensis</i> ; <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	
LAMA 1172	5,0	8,0	4,0	0,383	± 0,075	<i>Bacillus aerophilus</i> ; <i>Bacillus altitudinis</i> ; <i>Bacillus stratosphericus</i>	
LAMA 1114	2,5	8,0	0,5	0,553	± 0,064	<i>Bacillus aerophilus</i> ; <i>Bacillus altitudinis</i> ; <i>Bacillus stratosphericus</i>	
LAMA 1165	10,0	8,0	4,0		ND	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	
LAMA 1182	5,0	8,0	1,0		ND	<i>Bacillus anthracis</i>	
LAMA 1176	10,0	> 16,0	2,0		ND	<i>Bacillus cereus</i>	
LAMA 1164	10,0	> 16,0	4,0		ND	<i>Bacillus anthracis</i> ; <i>Bacillus cereus</i>	
LAMA 1170	> 20,0	> 16,0	> 4,0	3,527	± 0,375	<i>Serratia marcescens</i>	

Continuação Tabela 9.

Código do Isolado	Resistência Metal Pesado			Solubilização de Fosfato		Identificação da Cepa (16S rRNA)
	MIC Zn ⁺² (mM)	MIC Pb ⁺² (mM)	MIC Cd ⁺² (mM)	Índice de Solubilização (cm)		
LAMA 1142	2,5	8,0	4,0	2,627 ±	0,448	<i>Burkholderia tropica</i>
LAMA 1117	1,5	0,5	4,0	ND		<i>Methylobacterium komagatae</i>
LAMA 1161	5,0	0,5	0,5	1,263 ±	0,392	<i>Terriglobus roseus</i>
LAMA 1160	5,0	> 16,0	4,0	2,033 ±	0,265	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
LAMA 1151	2,5	8,0	1,0	2,150 ±	0,565	<i>Burkholderia tropica</i>
LAMA 1152	5,0	> 16,0	4,0	0,257 ±	0,080	<i>Mesorhizobium loti</i>
LAMA 1118	> 20,0	8,0	> 4,0	ND		<i>Paracoccus marinus</i>
LAMA 1119	2,5	4,0	4,0	ND		<i>Micrococcus yunnanensis</i>
LAMA 1174	10,0	8,0	> 4,0	1,470 ±	0,185	<i>Bacillus aerophilus</i> ; <i>Bacillus altitudinis</i> ; <i>Bacillus stratosphericus</i>
LAMA 1173	5,0	1,0	4,0	ND		<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
LAMA 1159	5,0	1,0	1,0	0,323 ±	0,157	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>
LAMA 1179	10,0	8,0	4,0	ND		<i>Brevibacillus borstelensis</i>
LAMA 1120	ND	ND	ND	ND		<i>Paenibacillus puldeungensis</i>
LAMA 1153	10,0	8,0	4,0	1,390 ±	0,290	<i>Bacillus safensis</i>
LAMA 1141	10,0	8,0	4,0	0,437 ±	0,289	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>
LAMA 1121	5,0	4,0	0,5	ND		<i>Brevibacillus brevis</i>
LAMA 1122	20,0	16,0	4,0	0,798 ±	0,078	<i>Bacillus cereus</i>

Continuação Tabela 9.

Código do Isolado	Resistência Metal Pesado			Solubilização de Fosfato		Identificação da Cepa (16S rRNA)	
	MIC Zn ⁺² (mM)	MIC Pb ⁺² (mM)	MIC Cd ⁺² (mM)	Índice de Solubilização (cm)			
LAMA 1123	2,5	8,0	0,5	1,137	±	0,228	<i>Paenibacillus pabuli</i>
LAMA 1124	ND	ND	ND	ND			<i>Paenibacillus aestuarii</i>
LAMA 1125	ND	ND	ND	ND			<i>Paenibacillus aestuarii</i>
LAMA 1126	20,0	16,0	4,0	0,390	±	0,141	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1127	10,0	16,0	2,0	0,480	±	0,138	<i>Bacillus toyonensis</i> ; <i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1128	2,5	16,0	1,0	0,577	±	0,025	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>
LAMA 1154	2,5	> 16,0	0,5	1,957	±	0,197	<i>Silvimonas iriomotensis</i>
LAMA 1129	2,5	8,0	0,5	1,250	±	0,224	<i>Paenibacillus pabuli</i> ; <i>Paenibacillus taichungensis</i>
LAMA 1130	1,5	16,0	4,0	0,660	±	0,040	<i>Burkholderia oxyphila</i>
LAMA 1131	20,0	16,0	4,0	ND			<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1132	2,5	16,0	2,0	ND			<i>Burkholderia oxyphila</i>
LAMA 1133	2,5	> 16,0	> 4,0	3,640	±	0,333	<i>Klebsiella variicola</i>
LAMA 1134	> 20,0	> 16,0	> 4,0	2,205	±	0,148	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
LAMA 1155	1,5	4,0	0,5	ND			<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>
LAMA 1135	10,0	16,0	4,0	0,675	±	0,148	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA 1156	10,0	8,0	2,0	1,223	±	0,332	<i>Rhizobium multihospitium</i>
LAMA 1136	0,5	8,0	0,5	ND			<i>Cohnella damuensis</i>

Continuação Tabela 9.

Código do Isolado	Resistência Metal Pesado			Solubilização de Fosfato		Identificação da Cepa (16S rRNA)	
	MIC Zn ⁺² (mM)	MIC Pb ⁺² (mM)	MIC Cd ⁺² (mM)	Índice de Solubilização (cm)			
LAMA 1137	0,5	1,0	0,5	ND			<i>Lysinibacillus massiliensis</i>
LAMA 1171	2,5	8,0	0,5	0,503	±	0,151	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>
LAMA 1158	5,0	4,0	0,5	ND			<i>Methylobacterium longum</i>
LAMA 1183	5,0	8,0	0,5	ND			<i>Bacillus anthracis</i> ; <i>Bacillus cereus</i>
LAMA 1138	5,0	0,5	0,5	ND			<i>Methylobacterium komagatae</i>
LAMA 1139	2,5	16,0	0,5	0,593	±	0,051	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> ; <i>Pseudomonas parafulva</i>
LAMA 1143	2,5	16,0	0,5	0,745	±	0,128	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i> ; <i>Pseudomonas parafulva</i>
LAMA 1140	5,0	8,0	4,0	0,103	±	0,023	<i>Bacillus aerophilus</i> ; <i>Bacillus altitudinis</i> ; <i>Bacillus stratosphericus</i>
LAMA 1157	10,0	8,0	4,0	0,273	±	0,025	<i>Rhizobium multihospitium</i>
LAMA 1175	10,0	8,0	> 4,0	0,790	±	0,299	<i>Bacillus aerophilus</i> ; <i>Bacillus altitudinis</i> ; <i>Bacillus stratosphericus</i>
LAMA 1163	2,5	1,0	1,0	ND			<i>Methylobacterium longum</i>
LAMA 1102	20,0	> 16,0	4,0	2,413	±	0,489	ND

ND= não determinado. Intervalo testado para as concentrações dos íons metálicos bivalentes: Zn de 0,5 a 20,0 mM, Pb de 0,5 a 16,0 mM e Cd de 0,5 a 4,0 mM. O índice de solubilização de fosfato foi calculado através da média ± desvio padrão (n= 4) do diâmetro total (halo+colônia) - diâmetro da colônia.

Para a comparação da resistência aos metais pesados por parte dos microrganismos avaliados foi estabelecido um referencial (mediante análise prévia da literatura), descrito a seguir:

- Potencial de resistência ao de zinco (Zn^{2+}): pouco tolerantes para as cepas que cresceram em concentrações inferiores a 10,0 mM, tolerantes para aquelas que cresceram entre 10,0 a 20,0 mM e super tolerante para as que conseguiram se desenvolver em concentrações superiores a 20,0 mM.
- Potencial de resistência ao chumbo (Pb^{2+}): pouco tolerantes para as cepas que cresceram em concentrações menores a 8,0 mM, tolerantes entre 8,0 e 16,0 mM e super tolerantes para concentrações maiores que 16,0 mM.
- Potencial de resistência ao cádmio (Cd^{2+}): concentrações inferiores a 2,0 mM foram consideradas pouco tolerantes para cádmio, enquanto, as que se desenvolveram entre 2,0 e 4,0 mM foram consideradas tolerantes e aquelas que cresceram em concentrações maiores a 4,0 mM foram consideradas super tolerantes.

Os dados relativos à resistência dos organismos endofíticos aos metais testados são apresentados na Tabela 10. Levando-se em consideração os critérios adotados quanto à resistência aos metais pesados analisados, foi verificado que em Siderópolis ocorreu o maior número de capazes de tolerar altas concentrações de metais pesados ($n=12$) – super tolerantes, enquanto que em Florianópolis o número de estirpes com potencial de resistência foi pouco menor, apresentando oito organismos (Tabela 10).

Sete cepas apresentaram considerável tolerância a elevadas concentrações de zinco no meio ($[\text{Zn}^{2+}] > 20,0 \text{ mM}$) sendo dessas, seis cepas isoladas de Siderópolis (LAMA 1118, LAMA 1134, LAMA 1145, LAMA 1146, LAMA 1167, LAMA 1170 e LAMA 1184) e apenas uma em Florianópolis (LAMA 1134). Além disso, outras trinta cepas apresentaram tolerância ao zinco, metade para cada local amostrado e por fim vinte e um isolados apresentaram pouca tolerância ao zinco em Siderópolis e trinta e dois em Florianópolis (Tabela 10).

Os resultado para o chumbo demonstraram um número ainda maior para microrganismos super tolerantes ($[] > 16,0 \text{ mM}$), totalizando doze endofíticos, dos quais sete são provenientes de Siderópolis (LAMA 1145, LAMA 1146, LAMA 1152, LAMA 1160, LAMA 1164, LAMA 1170 e LAMA 1176), e cinco foram obtidos de Florianópolis (LAMA 1102, LAMA 1133, LAMA 1134, LAMA 1154 e LAMA 1168). Ocorreram vinte e dois organismos tolerantes ao chumbo em Siderópolis, enquanto que em Florianópolis foram contabilizados trinta e dois. Os classificados como pouco tolerantes totalizaram treze para Siderópolis e onze em Florianópolis (Tabela 10).

Devido à elevada toxicidade do cádmio, as concentrações testadas foram menores. No total ocorreram 11 cepas super tolerantes ($[] > 4,0 \text{ mM}$). Dessas, seis foram obtidas em Siderópolis (LAMA 1088, LAMA 1118, LAMA 1146, LAMA 1170, LAMA 1174 e LAMA 1184) e cinco para Florianópolis (LAMA 1105, LAMA 1111, LAMA 1133, LAMA 1134 e LAMA 1175). O número de bactérias consideradas tolerantes foi equivalente para ambos os locais estudados, 23 cepas para cada ponto. Treze endofíticos foram considerados pouco resistentes em Siderópolis e vinte para Florianópolis (Tabela 10).

De todas as noventa e cinco cepas testadas, três foram super tolerantes a todos os metais testados, sendo elas as cepas LAMA 1146 - *Bacillus anthracis* ou *Bacillus cereus* (obtida de raiz de *Ocotea pulchella*), LAMA 1170 - *Serratia marcescens* (obtida de folha de *Miconia ligustroides*) e LAMA 1134 - *Raoultella ornithinolytica* (obtida de raiz de *Miconia ligustroides*). As duas primeiras isoladas de Siderópolis e a última em Florianópolis.

Do total de vinte endofíticos considerados super tolerantes dezesseis foram isolados de raízes e quatro de folhas (Tabela 10 e Anexo B). A planta que proporcionou o isolamento do maior número de super tolerantes foi *Ocotea pulchella* com um total de onze cepas.

Tabela 10: Classificação quanto à resistência dos endofíticos aos metais pesados zinco, chumbo e cádmio.**RESISTÊNCIA A ZINCO**

Pouco tolerantes	LAMA 1089	LAMA 1090	LAMA 1092	LAMA 1093	LAMA 1095	LAMA 1096	LAMA 1097	LAMA 1098	LAMA 1147
	LAMA 1148	LAMA 1182	LAMA 1142	LAMA 1166	LAMA 1117	LAMA 1161	LAMA 1160	LAMA 1151	LAMA 1152
	LAMA 1119	LAMA 1173	LAMA 1159	LAMA 1177	LAMA 1150	LAMA 1104	LAMA 1162	LAMA 1106	LAMA 1107
	LAMA 1108	LAMA 1109	LAMA 1110	LAMA 1178	LAMA 1169	LAMA 1172	LAMA 1114	LAMA 1121	LAMA 1123
	LAMA 1128	LAMA 1154	LAMA 1129	LAMA 1130	LAMA 1132	LAMA 1133	LAMA 1155	LAMA 1136	LAMA 1137
	LAMA 1171	LAMA 1158	LAMA 1183	LAMA 1138	LAMA 1139	LAMA 1143	LAMA 1140	LAMA 1163	
Tolerantes	LAMA 1088	LAMA 1091	LAMA 1185	LAMA 1099	LAMA 1100	LAMA 1149	LAMA 1181	LAMA 1101	LAMA 1165
	LAMA 1176	LAMA 1164	LAMA 1174	LAMA 1179	LAMA 1153	LAMA 1141	LAMA 1103	LAMA 1105	LAMA 1111
	LAMA 1112	LAMA 1113	LAMA 1168	LAMA 1122	LAMA 1126	LAMA 1127	LAMA 1131	LAMA 1135	LAMA 1156
	LAMA 1157	LAMA 1175	LAMA 1102						
Super Tolerantes	LAMA 1145	LAMA 1167	LAMA 1184	LAMA 1146	LAMA 1170	LAMA 1118	LAMA 1134		

Continuação Tabela 11:**RESISTÊNCIA A CHUMBO**

Pouco tolerantes	LAMA 1093	LAMA 1096	LAMA 1097	LAMA 1098	LAMA 1147	LAMA 1148	LAMA 1181	LAMA 1166	LAMA 1117
	LAMA 1161	LAMA 1119	LAMA 1173	LAMA 1159	LAMA 1177	LAMA 1150	LAMA 1104	LAMA 1162	LAMA 1109
	LAMA 1121	LAMA 1155	LAMA 1137	LAMA 1158	LAMA 1138	LAMA 1163			
Tolerantes	LAMA 1088	LAMA 1089	LAMA 1090	LAMA 1091	LAMA 1092	LAMA 1095	LAMA 1167	LAMA 1184	LAMA 1185
	LAMA 1099	LAMA 1100	LAMA 1149	LAMA 1101	LAMA 1165	LAMA 1182	LAMA 1142	LAMA 1151	LAMA 1118
	LAMA 1174	LAMA 1179	LAMA 1153	LAMA 1141	LAMA 1103	LAMA 1105	LAMA 1106	LAMA 1107	LAMA 1108
	LAMA 1110	LAMA 1111	LAMA 1178	LAMA 1169	LAMA 1112	LAMA 1113	LAMA 1172	LAMA 1114	LAMA 1122
	LAMA 1123	LAMA 1126	LAMA 1127	LAMA 1128	LAMA 1129	LAMA 1130	LAMA 1131	LAMA 1132	LAMA 1135
	LAMA 1156	LAMA 1136	LAMA 1171	LAMA 1183	LAMA 1139	LAMA 1143	LAMA 1140	LAMA 1157	LAMA 1175
Super Tolerantes	LAMA 1145	LAMA 1146	LAMA 1176	LAMA 1164	LAMA 1170	LAMA 1160	LAMA 1152	LAMA 1168	LAMA 1154
	LAMA 1133	LAMA 1134	LAMA 1102						

Continuação Tabela 12:**RESISTÊNCIA A CÁDMIO**

Pouco tolerantes	LAMA 1089	LAMA 1090	LAMA 1092	LAMA 1093	LAMA 1095	LAMA 1096	LAMA 1097	LAMA 1098	LAMA 1181
	LAMA 1182	LAMA 1161	LAMA 1151	LAMA 1159	LAMA 1108	LAMA 1110	LAMA 1178	LAMA 1169	LAMA 1114
	LAMA 1121	LAMA 1123	LAMA 1128	LAMA 1154	LAMA 1129	LAMA 1155	LAMA 1136	LAMA 1137	LAMA 1171
	LAMA 1158	LAMA 1183	LAMA 1138	LAMA 1139	LAMA 1143	LAMA 1163			
Tolerantes	LAMA 1091	LAMA 1147	LAMA 1145	LAMA 1167	LAMA 1185	LAMA 1099	LAMA 1100	LAMA 1148	LAMA 1149
	LAMA 1101	LAMA 1165	LAMA 1176	LAMA 1164	LAMA 1142	LAMA 1166	LAMA 1117	LAMA 1160	LAMA 1152
	LAMA 1119	LAMA 1173	LAMA 1179	LAMA 1153	LAMA 1141	LAMA 1177	LAMA 1103	LAMA 1150	LAMA 1104
	LAMA 1162	LAMA 1106	LAMA 1107	LAMA 1109	LAMA 1112	LAMA 1113	LAMA 1168	LAMA 1172	LAMA 1122
	LAMA 1126	LAMA 1127	LAMA 1130	LAMA 1131	LAMA 1132	LAMA 1135	LAMA 1156	LAMA 1140	LAMA 1157
	LAMA 1102								
Super Tolerantes	LAMA 1088	LAMA 1184	LAMA 1146	LAMA 1170	LAMA 1118	LAMA 1174	LAMA 1105	LAMA 1111	LAMA 1133
	LAMA 1134	LAMA 1175							

☒ Cepas isoladas em Siderópolis. ☐ Cepas isoladas em Florianópolis.

Diversos microrganismos endofíticos (n=60) apresentaram capacidade em solubilizar fosfato inorgânico em meio sólido, contribuindo para o aproveitamento de fontes menos solúveis (Tabela 10). Entre os organismos avaliados destacaram-se as cepas LAMA 1108, LAMA 1110, LAMA 1170, LAMA 1142, LAMA 1166, LAMA 1160, LAMA 1151, LAMA 1154, LAMA 1133, LAMA 1134, LAMA 1102, LAMA 1153, LAMA 1174, e LAMA 1148 por apresentarem índices de solubilidade maiores que 1,3 cm. Assim, esses microrganismos se mostraram capazes de aumentar a disponibilidade de fósforo solúvel, podendo favorecer o crescimento vegetal.

A amplificação por PCR do gene *nifD* demonstrou a presença deste gene estrutural da nitrogenase apenas no isolado LAMA 1179 (Figura 11), identificado como *Brevibacillus borstelensis*. Os isolados LAMA 1166 (*Mesorhizobium loti*) e LAMA 1173 (*Paenibacillus glucanolyticus*) amplificaram uma região diferente do gene *nifD* (630 bp). Esse gene só ocorre em microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e tem sido utilizado para monitorar a presença destes organismos em plantas.

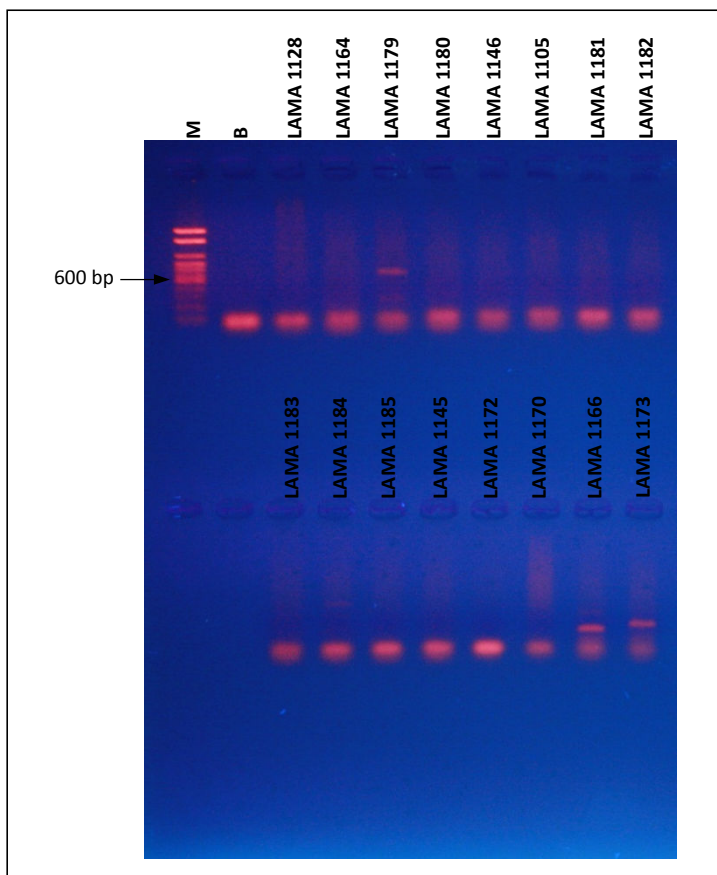


Figura 11: Imagem do gel de electroforese dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores específicos do gene *nifD*. M: LowRanger 100bp DNA Ladder; B: controle e os códigos LAMA indicam os organismos avaliados.

5 DISCUSSÃO

5.1 *Características dos Ambientes Estudados*

A avaliação geral dos parâmetros físico-químicos permitiu diferenciar os dois ambientes estudados neste trabalho e também sinalizar para o comprometimento dos recursos naturais que Siderópolis apresentou.

As amostras de solo e água proveniente do Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERVE) em Florianópolis apresentaram características ecológicas não comprometidas por contaminantes relacionadas à exploração do carvão. Os resultados ainda indicaram que as amostras encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação nacional vigente para os valores orientadores de qualidade do solo e água, quanto à presença de metais pesados (Resolução CONAMA nº 357/2005 e Resolução CONAMA nº 420/2009) e valores de condutividade (valores estes indicativos de baixa disponibilidade íons em solução). Os baixos valores de pH registrados no PAERVE caracterizam um ambiente ácido, nesse caso, produzido pela ação metabólica dos vegetais que compõem este tipo de solo, desencadeando assim, sua acidificação, em virtude principalmente da liberação de ácidos húmicos (PUGLISI et al., 2014) e também pela decomposição da matéria orgânica, fato este observado pelos valores elevados de carbono total. Puglisi et al. (2014), ao estudarem comunidades de bactérias e archeas em ambientes de turfeiras na Suíça, alcançaram valores ainda menores para os níveis de pH (3,7), evidenciando a acidificação natural dos ambientes colonizados por turfas.

Em relação aos locais de mineração, a dissolução de ácido sulfúrico produzido a partir das reações de oxirredução da pirita (FeS_2), oriundos dos estéreis de carvão, provocam a redução dos níveis de pH, tornando o ambiente ácido. Este fato, associado ao acúmulo e permanência de metais pesados (ASHRAF et al., 2011), provoca a dominância de espécies tolerantes, desencadeando uma redução na biodiversidade do ecossistema.

A região da Lagoa denominada Língua do Dragão, em Siderópolis, apresentou baixos valores de pH (chegando a 2,51 no

ponto 2), decorrente, em grande parte, da oxidação da pirita, gerando a drenagem ácida de mina. Assim, em termos de pH o solo dos dois ambientes apresenta certa similaridade, apesar de as causas dessa acidificação serem bem diferentes, ou seja, naturais na área do PAERVE e antropogênicas na área de Siderópolis. Possivelmente essa condição de pH ácido nos dois locais justifica a co-ocorrência de três das espécies vegetais estudadas, o que torna coerente a comparação de endofíticos entre elas. Entretanto, não se pode dizer o mesmo em relação as concentrações de metais pesados, bem maiores na região de Siderópolis.

O pH do ambiente exerce um importante papel, pois atua no controle da biodisponibilidade, mobilidade e precipitação dos íons metálicos (ESTEVES, 2011). Desta forma, em pH básico a maior parte dos íons metálicos se precipita na forma de hidróxido ou de sais básicos, enquanto que em pH baixos ocorre o processo contrário, pois em solução ácida os íons metálicos tem seu coeficiente de solubilidade aumentado, o que leva a uma maior mobilidade através das matrizes ambientais.

Com relação à concentração de metais pesados nas águas da Lagoa Língua do Dragão, foi observado que os elementos manganês, níquel e zinco estão muito acima dos limites estabelecidos pela Resolução Conama 357/2005 para águas da classe 2 – doces. A concentração de níquel ultrapassou cerca de 15 vezes o limite máximo permitido, enquanto os metais manganês e zinco ultrapassaram aproximadamente 200 vezes esse limite. Os resultados de metais obtidos para as águas da área do PAERVE, por outro lado, não ultrapassaram os limites para águas de classe 2. Esses dados indicam que é nítido o impacto proveniente da drenagem ácida de minas em Siderópolis.

Além disso, também se verificou a presença dos metais chumbo, cobre, manganês, níquel e zinco no solo, destacando-se a presença de chumbo no ponto 2, onde sua concentração foi superior uma vez e meia o limite de prevenção de acordo com a Resolução CONAMA 420/2009. Logo, apesar do tratamento químico prévio e obrigatório aplicado aos efluentes do beneficiamento de carvão no Lavador presente na Vila Funil, os valores de concentração de Mn, Ni, Zn e Pb estão acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente, sendo a

remoção de metais pesados de efluentes uma importante etapa das atividades industriais. Ainda, se verificou a elevada condutividade neste ambiente que chegou a $5,66 \text{ mS/cm}^2$, decorrentes do aumento da concentração de íons metálicos e presença de sais dissolvidos, caracterizando um ambiente extremamente redutor, e assim, corroborando com os valores de metais encontrados.

A matéria orgânica desempenha importante papel na dinâmica dos metais pesados, pois atua em processos de transporte e acumulação dos íons metálicos presentes no solo e na água, formando quelatos de diversas estabilidades e, em função das condições do meio, podendo precipitar ou entrar em solução.

O baixo pH do ambiente encontrado em Siderópolis, associado ao baixo teor de matéria orgânica ($2,564 \text{ mg.L}^{-1}$ de carbono orgânico na água e $5,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ como média para o solo), inviabiliza a precipitação dos metais pesados através de sua complexação com a matéria orgânica, facilitando assim, sua solubilização nas matrizes ambientais. De maneira geral, os resultados dos parâmetros analisados como baixo pH, elevada condutividade, baixo teor de matéria orgânica e, sobretudo o grande aporte de metais pesados oriundos da DAM, demonstram o comprometimento da água e do solo no município de Siderópolis, sinalizando para eminentes ações de recuperação deste ambiente estudado.

A partir do trabalho de Freitas et al. (2011), que determinou o acúmulo de metais presentes na comunidade de algas nos rios da região carbonífera do Estado de Santa Catarina, podemos constatar que os resultados obtidos corroboram com os do presente estudo, pois foi verificado baixo pH variando de 2,9 a 4,1, elevada condutividade $0,381$ a $1,791 \text{ mS/cm}^2$, e presença de metais tais como: zinco ($0,44$ a $4,67 \text{ mg.L}^{-1}$), manganês ($0,35$ a $4,87 \text{ mg.L}^{-1}$) e ferro ($5,0$ a $137,7 \text{ mg.L}^{-1}$).

Comparando os dados de pH e concentração de metais obtidos para Siderópolis e Florianópolis à outros ambientes, por sua vez contaminados pela drenagem ácida de minas, podemos perceber certa semelhança entre os níveis de metal e pH obtidos para os ambientes contaminados pela DAM. Para alguns metais como chumbo, manganês e zinco suas concentrações foram maiores para Siderópolis do que para os outros locais, confirmando o comprometimento do ambiente (Tabela 11).

Tabela 13: Valores reportados para pH e metais dissolvidos em países impactados pela drenagem ácida de minas.

País	pH	Pb	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	Ref.
Estados Unidos	0,83	-	4,1	50,0	-	-	14,0	*
Japão	2,30	-	-	276,0	-	-	-	*
Inglaterra	3,40	-	-	15,0	7,8	-	-	*
Inglaterra	-	-	0,4	140,0	23,0	-	75,0	*
Alemanha (Lago)	2,1-2,5	-	0,004-0,047	390,0-670,0	1,3-43,5	-	1,69-2,91	*
Nova Zelândia	2,7-6,2	-	-	0,2-32,6	-	-	-	*
Nova Zelândia	2,8	-	0,012-0,016	36,5-37,0	0,43-0,44	-	0,53-0,54	*
Nova Zelândia	2,7-7,7	-	-	0,1-84,5	-	-	0,001-0,92	*
África do Sul	1,88	-	3,49	98,95	-	-	7,16	*
								*
Brasil – Siderópolis (DAM)	3,0-3,5	-	-	140,8	20,1	0,371	36,02	**
Brasil – Siderópolis (Soil)	2,51-3,34	6,0-109,0	5,2-8,0	17.019-20000	15,5-181,0	2,7	5,7-120,0	**
Brasil – Florianópolis (Water)	5,0	-	-	-	-	-	-	**
Brasil – Florianópolis (Soil)	2,53-4,16	15,6	-	698-5.520	2,9-14,0	-	9,7-11,8	**

Valores reportados para concentração de metais dissolvidos na água em mg.L^{-1} , com exceção da amostras de Siderópolis e Florianópolis para solo valores estes expressos em mg.kg^{-1} . * NOVIS; HARDING, 2007. ** do autor.

5.2 Diversidade de Microrganismos Endofíticos nas Plantas Estudadas

O protocolo de esterilização superficial para remoção da comunidade microbiana epifítica foi um pré-requisito no processo de isolamento de bactérias endofíticas. Este estudo mostrou que a esterilização da superfície dos tecidos tratados foi eficaz na remoção desses microrganismos, e que os isolados bacterianos foram considerados como verdadeiras bactérias endofíticas.

A densidade das bactérias totais cultiváveis foi diferente entre raízes e tecidos foliares. As bactérias endofíticas em Siderópolis oscilaram entre $2,98.10^2$ a $1,25. 10^3$ NMP/g (ambos em *Miconia ligustroides*) para as raízes e $6,30.10^1$ (*Ocotea pulchella*) a $4,34.10^3$ NMP/g (*Miconia ligustroides*) para as folhas. Para Florianópolis foi verificada oscilação entre $1,15.10^2$ a $5,42.10^2$ NMP/g (ambos em *Miconia ligustroides*) para as raízes e $6,77.10^1$ (*Miconia ligustroides*) a $6,22.10^2$ NMP/g (*Ocotea pulchella*) para as folhas. A densidade da comunidade endofítica no ambiente contaminado foi relativamente maior. Os dados da literatura são escassos em relação a comparações de ambientes impactados e não impactados para endofíticos. Dessa forma, sugere-se que a densidade tenha sido maior em Siderópolis, visto os benefícios que esta associação pode conferir as plantas, seja fornecendo reguladores de crescimento, disponibilização de nutrientes, resistência a metais ou ainda reduzindo o estresse oxidativo. Bactérias endofíticas foram localizadas principalmente nas raízes, apresentado um gradiente decrescente das raízes às folhas. Resultados semelhantes foram relatados em tremoço amarelo, tiririca e soja (BARAC et al., 2004; IKEDA et al., 2010; RAJKUMAR et al., 2009a; BHARGAVA et al., 2012), sugerindo que os endofíticos podem se locomover das raízes para as partes superiores da planta, durante o desenvolvimento vegetal. Além disso, estes resultados indicam ser a raiz a principal região de entrada dos endofíticos. Outro indício da elevada incidência de colonização das raízes pelo endofíticos se deve a presença de altos níveis de nutrientes localizados na rizosfera. Com base na morfologia das colônias (cor, forma e tamanho), um total de cento e quatorze bactérias endofíticas foram isoladas a partir dos tecidos de quatro espécies vegetais diferentes. Apesar de não ser observada influência dos parâmetros físico-químicos analisados sobre a densidade

populacional da comunidade endofítica, pode-se verificar que estes influenciaram o número de cepas isoladas e, consequentemente, as OTUs endofíticas, uma vez que as comunidades bacterianas presentes no interior das plantas são propensas a influências causadas pelo ambiente, promovendo mudanças na estrutura da comunidade endofítica (VAN OVERBEEK et al., 2008; GAGNE-BOURGUE et al., 2012). Sendo assim, acredita-se que a oposição constatada entre a densidade populacional e a diversidade de endofíticos entre Siderópolis e Florianópolis foi influenciada preponderantemente pela acentuada diferença dos ambientes (em especial pH e concentração de metais), fatores estes capazes de selecionar microrganismos resistentes, reduzindo sua biodiversidade, mas possivelmente compensando em densidade celular, podendo assim, conferir vantagens aos organismos associados. Bacon e Hinton (2006) afirmaram ainda que além dos fatores ambientais capazes de alterar o número de endofíticos bacterianos presentes nos tecidos vegetais, os genótipos bacterianos e da planta podem alterar a densidade celular microbiana.

Embora o foco do trabalho não esteja relacionado à caracterização sazonal desses microrganismos, foi possível observar uma diminuição dos organismos isolados em estações mais quentes, como a primavera. Ainda que, pouco se conheça sobre a interferência dos componentes ambientais no crescimento dos endofíticos, pode-se supor que o menor número de isolados na primavera se deva a algum parâmetro ambiental.

Os endofíticos cultivados a partir de tecidos vegetais provenientes de 4 plantas diferentes totalizaram em 114 cepas isoladas conforme mencionando anteriormente, estando distribuídas em 4 filos distintos: Acidobacterias (classe Acidobacterales), Actinobacteria (classe Actinobacteridae), Firmicutes (classe Bacilli) e Proteobacteria (classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria). A maior parte das espécies presentes nestes filos de bactérias já foram associadas como bactérias endofíticas (IDRIS et al., 2004; BACON; HINTON, 2006; BARZANTI et al., 2007; SUN et al., 2010; GAGNE-BOURGUE et al., 2012; JASIM et al., 2013; ZHU et al., 2014).

As bactérias endofíticas pertencentes ao filo Firmicutes predominaram em ambos os ambientes estudados. No estudo de

Bacon e Hinton (2006), referente à ocupação e nicho desempenhado pelos endofíticos, foi relatado a existência de um maior número de espécies gram-negativas colonizando os tecidos vegetais. Entretanto, estudos recentes em ambientes de minas e solo contaminado por metais pesados reportaram a dominância de bactérias endofíticas pertencentes ao filo Firmicutes (KABAGALE et al., 2010; SUN et al., 2010; ZHU et al., 2014). Isso não é inesperado, visto que, este filo também é encontrado com alta frequência na rizosfera de locais contaminados (ELLIS et al., 2003; RYAN et al., 2008; NAVARRO-NOYA et al., 2010). Além disso, Navarro-Noya et al. (2010), identificaram os filos Proteobacteria, Acidobacterias e Actinobacteria na rizosfera, os mesmos encontrados no presente estudo, dessa forma em ambientes contaminados por metais pesados alguns dos isolados endófitos podem preferencialmente colonizar a planta através do sistema radicular.

Para os locais amostrados, ocorreram 31 OTUs em Siderópolis e 34 em Florianópolis, aparentemente, não ocorrendo diferença relevante na diversidade para os locais, mas ao igualarmos o número de plantas (retirando as OTUs geradas a partir de *Tibouchina ramboi* em Siderópolis) nos dois locais, podemos perceber que a diversidade aumentou consideravelmente em Florianópolis, restando assim, 24 OTUs para Siderópolis. Em trabalho semelhante, foram encontrados 15 OTUs de endofíticos cultiváveis obtidos de *Salix caprea*, planta esta, presente na área de uma antiga mina de chumbo e zinco na Áustria (KUFFNER et al., 2010). Esta diferença na composição da comunidade de bactérias endofíticas para os dois locais, pode estar relacionada às condições do solo e concentração de metais, como proposto por Sun et al. (2010) no estudo da comunidade de bactérias endofíticas resistentes a cobre.

Os endofíticos identificados pertenciam a 59 gêneros de bactérias, sendo desses, 7 comuns aos dois ambientes estudados, demonstrando uma diferença acentuada na estrutura da comunidade endofítica colonizadora de ambientes impactados por metais pesados e não impactados. Em virtude dessa acentuada diferença na composição estrutural da comunidade endofítica nos ambientes estudados, sugere-se que o papel dos endofíticos encontrados em Siderópolis esteja relacionado diretamente à obtenção de agentes/fatores que atuem nos processos de fitorremediação, auxiliando a planta a superar as

condições adversas que o ambiente lhe impõe. Trabalhos vêm demonstrando o benefício conferido as plantas quando essa possui microrganismos endofíticos colonizando seus tecidos, pois foram capazes de liberar hormônios vegetais, aumentar a absorção total de metais pesados e aumentar a produção de biomassa vegetal (WEYENS et al., 2011; MA et al., 2011; SHIN et al., 2012; WAN et al., 2012). Esses resultados representam um avanço na melhoria da fitorremediação de locais contaminado através da participação efetiva dos microrganismos endofíticos.

Em Siderópolis o grupo filogenético Bacilli apresentou a maior diversidade e abundância de endofíticos isolados. Isso se deve, em parte, a capacidade do grupo em se adaptar as diferentes condições ambientais que estão expostos, apresentando mecanismos fisiológicos e metabólicos diversificados, além é claro, de serem capazes de produzirem endóporos garantindo sua permanência em ambientes com alto estresse ambiental. O gênero *Bacillus* apresentou a maior frequência de OTUs, doze no total, seguido pelo gênero *Paenibacillus* com 5 OTUs. É conhecido que muitas espécies destes gêneros são consideradas agentes de biocontrole de doenças de plantas, o que demonstra grande potencial biotecnológico. *Bacillus cereus* foi a espécie mais encontrada em Siderópolis, sendo localizada nos tecidos de *Eleocharis*, *Miconia* e *Tibouchina*.

O segundo grupo com a maior diversidade de OTUs em Siderópolis foi Alphaproteobacteria, grupo este que incluem muitas das bactérias responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico (SANTI et al., 2013). Nesta classe foi encontrado o gênero *Paracoccus* que poucas vezes foi reportado como microrganismo endofítico. A espécie identificada como *Paracoccus maris* foi inicialmente isolada a partir da água do mar do porto Kisarazu na Baía de Tóquio (KHAN et al., 2008), não sendo até o momento reportada como endofítico ou patógeno de planta.

Os resultados mostraram que as bactérias endofíticas isoladas em Siderópolis ocorreram preferencialmente em plantas com hábitos arbóreos e arbustivos. Não foi observada uma distribuição padronizada para as OTUs. As plantas *Miconia ligustroides* e *Tibouchina ramboi* foram colonizadas preferencialmente por bactérias endofíticas da classe Bacilli, enquanto que *Ocotea pulchella* pela classe

Alphaproteobacteria. Existem muitas possibilidades para o estabelecimento da comunidade endofítica em plantas, que vão desde a presença desses microrganismos nas sementes até a seleção das bactérias por parte das plantas, seja através da liberação de compostos orgânicos ou pelo desenvolvimento de ambiente muito seletivo (SUN et al., 2010). Sendo assim, se faz necessário mais estudos a cerca do processo de formação da comunidade endofítica, para melhor compreensão de como se dá a disposição dessa composição na colonização dos tecidos vegetais.

Para Florianópolis a classe Bacilli também foi a que apresentou a maior diversidade e frequência de microrganismos isolados, sendo o gênero *Bacillus* o que apresentou a maior frequência de OTUs, como em Siderópolis, demonstrando mais uma vez a elevada capacidade desse grupo em se estabelecer como endofíticos. As classes Alphaproteobacteria, betaproteobacteria e Gammaproteobacteria apresentaram respectivamente, 3, 5 e 5 OTUs, formando o filo Proteobacteria e sendo após Bacilli (nesse caso Firmicutes) o segundo grupo com a maior diversidade de espécies.

Em Florianópolis podemos perceber uma inversão na composição de endofíticos associados a *Eleocharis* sp. e *Miconia ligustroides*. Enquanto, ocorreram 2 OTUs para *Eleocharis* em Siderópolis, para Florianópolis foram 13 OTUs para *Eleocharis*. Dessa forma podemos verificar que a exposição as condições adversas provocadas pela DAM reduziram a associação simbiótica planta-endofítico. Para *Miconia* verificamos o processo contrário, sendo que em Siderópolis esta espécie apresentou o maior número de OTUs, enquanto que, em Florianópolis o menor número (4 OTUs), sugerindo o quanto os endofíticos cooperam para o estabelecimento e desenvolvimento dessa espécie vegetal.

A alteração constatada na distribuição de endofíticos em virtude das espécies vegetais/ambientes, já era esperada, uma vez que muitas pesquisas reportaram o enorme passivo ambiental decorrente de anos de exploração do carvão sem medidas de recuperação desse ambiente.

5.3 *Características Fisiológicas dos Microrganismos Endofíticos e seu Possível Papel nas Plantas*

Foi isolado um grupo diversificado de microrganismos endofíticos a partir de amostras coletadas em Siderópolis e Florianópolis, locais com e sem impacto promovido pela DAM, e de quatro espécies diferentes de plantas.

Neste estudo, muitos isolados foram capazes de crescer na presença de metais pesados. No entanto, apenas um grupo seletivo de microrganismos foi capaz de tolerar elevadas concentrações dos íons metálicos Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} , podendo auxiliar no processo de remediação de locais impactados por tais contaminantes. Vários trabalhos tem apontado para o papel fundamental dos endofíticos na adaptação de plantas as alterações ambientais (RAJKUMAR et al. 2009a; 2009b). Esses microrganismos podem alterar o metabolismo da célula da planta, de modo que, por exposição ao estresse de metais pesados, estas são capazes de tolerar concentrações elevadas de metais e, portanto, podem suportar as condições adversas (MA et al., 2011).

Siderópolis, como esperado, apresentou o maior número de isolados resistentes a altas concentrações de metais para todos os metais analisados. Esses isolados apresentaram tolerância a metais pesados em concentrações semelhantes às descritas na literatura, apresentando, assim, um uso potencial na fitorremediação de locais contaminados com metais pesados, como a DAM ou outros locais que sofrem ação antrópica, devido ao aporte de metais. Dentre as espécies super tolerantes para Siderópolis, a classe Bacilli foi a mais abundante, com oito representantes. Vários autores têm demonstrado que essa classe participa efetivamente em processos de promoção do crescimento vegetal e fitorremediação, seja através da produção de sideróforos, solubilização de fosfato, atividade enzimática (ACC desaminase e arginina descarboxilase), resistência e fitoextração de cobre, níquel, chumbo, cádmio e ainda outros metais (PÉREZ-MIRANDA et al. 2007; GLICK, 2010; SUN et al., 2010; MA et al., 2011). Assim, a classe Bacilli vem atuando diretamente na interação planta-endofítico na superação e detoxificação da DAM.

Os resultados mostraram que os três isolados designados LAMA 1134, LAMA 1146 e LAMA 1170, apresentaram co-resistência aos elevados níveis (super tolerantes) de metais pesados Zn-Pb-Cd. A espécie encontrada em Florianópolis – *Raoultella ornithinolytica* (LAMA 1134) – faz parte de um gênero recentemente descrito, podendo ser encontrada em solo e água (DRANCOURT et al., 2001). No entanto, estudos clínicos tem relacionado *R. ornithinolytica* com bactérias produtoras de histamina, causando infecções e prejuízos a saúde humana (MORAIS et al., 2009; KHAJURIA et al., 2013). Sendo assim, se faz necessário maiores investigações a cerca de sua associação com plantas, pois até o momento não foram encontradas citações desta espécie como endofítico. Já os outros dois isolados (*Serratia marcescens* e *Bacillus cereus/Bacillus anthracis*) foram reportados em outros trabalhos como endofíticos, participando ativamente em processos de promoção do crescimento da planta, e também na resistência, extração e hiperacumulação de metais pesados (ELLIS et al., 2003; GLICK, 2010; SUN et al., 2010; MA et al., 2011; SRINATH; BABU, 2014). Elas podem estabelecer associações mutualistas com os anfitriões, promovendo uma melhor adaptação das plantas hospedeiras no ambiente através de, por exemplo, imobilização de metais pesados, que são tóxicos para as plantas (DOURADO et al., 2012). Desta forma, essas cepas bacterianas endofíticas altamente adaptadas ao estresse provocado pelos metais pesados podem ter potencial biotecnológico para melhorar a aplicabilidade e eficiência da fitoextração, sendo aproveitadas em processos de fitorremediação.

Além disso, bactérias endofíticas podem melhorar a disponibilidade de fósforo, que é conhecido por ser um dos principais nutrientes minerais essenciais para o crescimento das plantas. Embora os solos possam apresentar reservas de fosfatos totais, para as plantas, geralmente apenas uma pequena porção desse total é capaz de ser assimilada, devido à sua fixação química e baixa solubilidade (STEVENSON; COLE, 1999). Ao mesmo tempo, os níveis elevados de metais pesados no solo interferem na absorção de fosfatos e retardam o crescimento das plantas (CHEN et al., 2010). Os resultados indicam que os endofíticos isolados são capazes de superar esta limitação para a planta, pois a maioria dos isolados testados apresentou a capacidade de solubilizar fosfato insólúvel, podendo assim, disponibilizar para as

células vegetais. Das 60 cepas que possuem habilidade em solubilizar fosfato inorgânico, destacam-se os gêneros *Pantoea*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Serratia*, *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*, sendo os três primeiros encontrados em Florianópolis e os quatro últimos em Siderópolis.

Outro elemento indispensável às plantas se trata do nitrogênio, elemento presente, por exemplo, nos aminoácidos, proteínas, DNA e RNA. Apesar do nitrogênio ser abundante na atmosfera, as plantas não são capazes de metabolizá-lo e retirá-lo diretamente do ar. As bactérias fixadoras de nitrogênio são as responsáveis por transformar o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis para plantas. Assim, uma das formas de promover o crescimento de plantas é disponibilizar nitrogênio assimilável (SHIN et al., 2012). Apesar de ter-se testado cerca de 33% dos endofíticos para apenas um dos genes estruturais que codificam a enzima nitrogenase, verificou-se que, a cepa LAMA 1179 – *Brevibacillus borstelensis* – apresentou um tamanho de banda próximo ao do gene nifD. Ainda é necessário avaliar o restante dos isolados para este gene, como também para os outros genes codificantes desta enzima. Além disso, se faz necessário realizar testes para avaliar a capacidade de fixação de nitrogênio e assim, selecionar as melhores cepas que poderão ser utilizadas em processos de fitorremediação.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados desse estudo é possível concluir que:

- As concentrações dos metais chumbo, manganês, níquel e zinco estão acima do permitido pela legislação brasileira, ocasionando o comprometimento da água e do solo no município de Siderópolis.
- A composição da comunidade endofítica variou entre Siderópolis e Florianópolis, demonstrando que a elevada concentração de metais pesados, em especial chumbo e zinco, associado ao baixo pH presentes na DAM promoveu essa diferenciação.
- A classe dominante nos tecidos vegetais estudados para Siderópolis foi Bacilli.
- As cepas endofíticas isoladas dos tecidos das plantas coletadas em Siderópolis foram mais resistentes aos metais pesados.
- *Ocotea pulchella* foi a planta que apresentou o maior número de isolados resistentes aos metais analisados.
- A quantidade de cepas com índice de solubilização de fosfato inorgânico superior a 1,3 cm foi maior em Siderópolis.
- As cepas LAMA 1146 (*Bacillus anthracis* / *Bacillus cereus*), LAMA 1170 (*Serratia marcescens*) e LAMA 1179 (*Brevibacillus borstelensis*) são endofíticas que participam nos processos de fitorremediação e/ou promoção do crescimento vegetal.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É necessário que o poder público continue fiscalizando e aplicando restrições as empresas carboníferas do Estado de Santa Catarina que estiverem em desacordo com a legislação a respeito dos efluentes produzidos.

Faz-se necessário ainda compreender melhor a interação entre as plantas e os endofíticos deste trabalho, através de outros testes como avaliação da atividade da ACC desaminase, produção de AIA, produção de sideróforos e ainda concluir a avaliação do gene referente à enzima nitrogenase, bem como, avaliar o potencial das cepas que apresentarem a enzima em fixarem nitrogênio atmosférico.

8 REFERÊNCIAS

ALLOWAY, B. J. Soil processes and the behavior of heavy metals. In: ALLOWAY, B. J. (Ed.). Heavy Metals in Soils. Blackie Academic & Professional, New York, pp. 11-25, 1995.

ALVES, S.; NABAIS, C.; GONÇALVES, M. L. S.; SANTOS, M. M. C. Nickel speciation in the xylem sap of the hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* growing on serpentine soils of northeast Portugal. Journal of Plant Physiology, v. 168, p. 1715-1722, 2011.

APHA - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st. Edition APHA, AWWA, WEF.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. Canadian Journal of Microbiology, v. 47, p. 229-236, 2001.

ASHRAF, M. A.; MAAH, M. J.; Yusoff, I. Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. International Journal of Environmental Science and Technology, v. 8, p. 401-416, 2011.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. Plant-Associated Bacteria, p. 155-194, 2006.

BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J. V.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. Nature Biotechnology, v. 22, p. 583-588, 2004.

BARKA, E. A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-

promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. Applied and Environmental Microbiology, v.72, p. 7246–52, 2006.

BARZANTI, R.; OZINO, F.; BAZZICALUPO, M.; GABBRIELLI, R.; GALARDI, F.; GONNELLI, C.; MENGONI, A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. Microbial Ecology, v. 53, p. 306-316, 2007.

BHARGAVA, A.; CARMONA, F. F.; BHARGAVA, M.; SRIVASTAVA, S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. Journal of Environmental Management, v. 105, p. 103-120, 2012.

BRASIL. Resolução CONAMA 357/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/>. Acesso em 06 de agosto de 2014.

BRASIL. Resolução CONAMA 357/2005. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/>. Acesso em 06 de agosto de 2014.

CHAUDRI, A. M.; ALLAIN, C. M. G.; JEFFERSON, V. L. B.; NICHOLSON, F. A.; CHAMBERS, B. J.; McGRATH, S.P. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term fields experiment. Plant and Soil, v. 221, p. 167-179, 2000.

CHEN, L.; LUO, S.; XIAO, X.; GUO, H.; CHEN, J.; WAN, Y.; LI, B.; XU, T.; XIC, Q.; RAO, C.; LIU, C.; ZENG, G. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. Applied Soil Ecology, v. 46, p. 383-389, 2010.

CONRATH, U.; CONRATH, G. J. M.; FLORS, V. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, p. 1062-1071, 2006.

CTCL – CENTRO TECNOLÓGICO DE CARVÃO LIMPO. Banco de Dados NMA – Monitoramento – Conveniado CSN – Campo Vila Funil. Mantido pela Associação Beneficente da Indústria Carbonífera de Santa Catarina, 2013.

DOURADO, M. N.; FERREIRA, A.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. T. The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology Research International*. Doi:10.1155/2012/759865, 2012.

DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 925-932, 2001.

DU, R. J.; HE, E. K.; TANG, Y. T.; HU, P. J.; YING, R. R.; MOREL, J. L.; QIU, R. L. How phytohormone IAA and chelator EDTA affect lead uptake by Zn/Cd hyper- accumulator *Picris divaricata*. *International Journal of Phytoremediation*, v. 13, p. 1024-1036, 2011.

ELLIS, R. J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY, J. C. Cultivation dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy metal contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3223-3230, 2003.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Manual de métodos de análise de solo / Centro Nacional de Pesquisa de Solos. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro, 1997. 212p., il.

ENT, A.; BAKER, A. J. M.; REEVES, R. D.; POLLARD, A. J.; SCHAT, H. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*, v. 362, p. 319-334, 2013.

ESTEVEZ, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2 ed., 602 p., 2011.

FREITAS, H.; PRASAD, M. N. V.; PRATAS, J. Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International*, v. 30, p. 65-72, 2004.

FREITAS, A. P. P.; SCHMEIDER, I. A. H.; SCHWARTZBOLD, A. Biosorption of heavy metals by algal communities in water streams affected by the acid mine drainage in the coal-mining region of Santa Catarina state, Brazil. *Minerals Engineering*, v. 24, p. 1215-1218, 2011.

GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K. A.; SEGUIN, P.; RANI, M.; SAMSON, R.; JABAJI, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, p. 836-853, 2012.

GEREMIAS, R.; BORTOLOTO, T.; WILHELM-FILHO, D.; PEDROSA, R. C.; DE FÁVERE, V. T. Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coalmining waste using *Allium cepa* L. as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 79, p. 116-121, 2012.

GLICK, B. R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 367-74, 2010.

GRČMAN, H.; VELIKONJA-BOLTA, S.; VODNIK, D.; KOS, B.; LESTAN, D. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil*, v. 235, p. 105-114, 2001.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1-11, 2002.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, v. 16, p. 463-71, 2008.

HAYASHI, H.; TAKAHASHI, R.; NISHI, T.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, p. 1093-1101, 2005.

HEBERLE, D. A. Heterogeneidade ambiental do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. 2011. 131f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Territorial e Desenvolvimento Socioambiental). Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis.

IBGE. Disponível em:
<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=421760&idtema=123&search=santa-catarina|sideropolis|producao-agricola-municipal-lavoura-temporaria>. Acesso em 10 de junho de 2014.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W. W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, p. 2667-2677, 2004.

IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; TERASAWA, K.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Community and genome based views of plant-associated bacteria: plant–bacterial interactions in Soybean and Rice. *Plant Cell Physiology*, v. 51, p. 1398-1410, 2010.

JASIM, B.; JIMTHA, J. C.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. *Plant Growth Regulation*, v. 71, p. 1-11, 2013.

JING Y.; HE, Z.; YANG, X. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science*, v. 8, p. 192–207, 2007.

KABAGALE, A. C.; CORNU, B.; VLIET, F.; MEYER, C.-L.; MERGEAY, M.; LUMBU-SIMBI, J. B.; VERBRUGGEN, N. Diversity of endophytic bacteria from the cuprophytes *Haumaniastrum katangense* and *Crepidiorhopalon tenuis*. *Plant and Soil*, v. 334, p. 461-474, 2010.

KHAJURIA, A.; PRAHARAJ, A. K.; GROVER, N.; KUMAR, M. First Report of bla_{NDM-1} in *Raoultella ornithinolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p.1092-1093, 2013.

KHAN, S. T.; TAKAICHI, S.; HARAYAMA, S. *Paracoccus marinus* sp. nov., an adonixanthin

Digluco-side producing bacterium isolated from coastal seawater in Tokyo Bay. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 383-386, 2008.

KREBS, A. S. J. Avaliação do potencial hidrogeológico da área correspondente à bacia hidrográfica do rio Araranguá, SC. Criciúma: UNESC, 1997.

KUFFNER, M.; DE MARIA, S.; PUSCHENREITER, M.; FALLMANN, K.; WIESHAMMER, G.; GORFER, M.; STRAUSS, J.; RIVELLI, A. R.; SESSITSCH, A. Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 1471-1484, 2010.

KUMAR, K. V.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, N.; BEHL, H. M. Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170, p. 51-57, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), Chichester, Reino Unido. 1991.

LEDIN, M.; PEDERSEN, K. The environmental impact of mine wastes—roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews*, v. 41, p. 67-108, 1996.

LODEWYCKX, C.; TAGHAVI, S. MERGEAY, M.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H.; VAN DER LELIE, D. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. *International Journal of Phytoremediation*, v. 3, p. 173-187, 2001.

LODEWYCKX, C.; MERGEAY, M.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H.; VAN DER LELIE, D. Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *International Journal of Phytoremediation*, v. 4, p. 101-115, 2002.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; LUO, Y.; FREITAS, H. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants: effects on plant growth and Ni uptake. *Journal of Hazardous Materials*, v. 195, p. 230-237, 2011.

MADHAYIAN, M.; POONGUZHALI, S.; SA, T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, v. 69, p. 220-228, 2007.

MANSUR S. A.; GADE, M. F. Risk assessment of pesticides and heavy metals contaminants in vegetables: a novel bioassay method using *Daphnia magna* Straus. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 377–89, 2010.

McGRATH, S. W.; ZHAO, F. J.; LOMBI, E. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal- contaminated soils. *Plant and Soil*, v. 232, p. 207-214, 2001.

MAZUMDAR, K.; DAS, S. Phytoremediation of Pb, Zn, Fe, and Mg with 25 wetland plant species from a paper mill contaminated site in North

East India. Environmental Science and Pollution Research. DOI 10.1007/s11356-014-3377-7, 2014.

MELLO, J. W. V.; ABRAHÃO, W. A. P. Geoquímica da drenagem ácida. In: DIAS, L. D.; MELLO, J. W. V. (Org.). Recuperação de áreas degradadas. Viçosa: UFV, p. 45-57, 1998.

MORADI, A. B.; SWOBODA, S.; ROBINSON, B.; PROHASKA, T.; KAESTNER, A.; OSWALD, S. E.; WENZEL, W. W.; SCHULIN, R. Mapping of nickel in root cross-sections of the hyperaccumulator plant *Berkheya coddii* using laser ablation ICP-MS. Environmental and Experimental Botany, v.69, p. 24-31, 2011.

MORAIS, V. P.; DAPORTA, M. T.; BAO, A. F.; CAMPELLO, M. G.; ANDRÉS, G. Q. Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (Klebsiella ornithinolytica). Journal of Clinical Microbiology, v. 47, p. 868-869, 2009.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta, v.26, p.31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, v. 170, p. 265-270, 1999.

NAVARRO-NOYA, Y. E.; JAN-ROBLERO, J.; GONZALÉZ-CHAVÉZ, M. C.; HERNÁNDEZ-GAMA, R.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopoda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. Antonie van Leeuwenhoek, v. 97, p. 335-349, 2010.

NOVIS, P. M.; HARDING, J. S. Extreme acidophiles: freshwater algae associated with acid mine drainage. SECKBACH, J. (Ed.). Algae and cyanobacteria in extreme environment. Springer: The Netherlands, p. 44-463, 2007.

ODRESKI, L. F. R. Influência hidrológica nos processos hidrodinâmicos da Lagoa da Conceição. 2012. 120p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Plant and Soil*, v. 184, p. 105-126, 2007.

PALMQUIST, H.; HANÆUS, J. A Swedish overview of selecting hazardous substances as pollution indicators in wastewater. *Management of Environmental Quality: an International Journal*, v. 15 (2), p. 186-203, 2004.

PÉREZ-MIRANDA, S.; CABIROL, N.; GEORGE-TÉLLEZ, R.; ZAMUDIO-RIVERA, L. S.; FERNÁNDEZ, F. J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, v. 70, p. 127-131, 2007.

PILLAY, V. K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 354-361, 1997.

POSTMA, J. W. M.; OLSSON, P. A.; FALKENGREN-GRERUP, U. Root colonization by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 39, p. 400-408, 2007.

PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SANTA CATARINA. Portal da Ação Cível Pública do Carvão. Disponível em <www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/index.php>. Acesso em 14 de junho de 2014.

PUGLISI, E.; ZACCONE, C.; CAPPA, F.; COCCONCELLI, P. S.; SHOTYK, W.; TREVISAN, M.; MIANO, T. M. Changes in bacterial and archaeal

community assemblages along an ombro trophic peat bog profile. *Biology and Fertility of Soils*. DOI 10.1007/s00374-014-0902-2, 2014.

RAJAKARUNA, N.; BAKER, A. J. M. Serpentine: a model habitat for botanical research in Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*, v. 32, p. 1-19, 2006.

RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, v.77, p. 153-160, 2009.

RAJKUMAR, M., PRASAD, M. N. V., FREITAS, H., AE, N. Biotechnological applications of serpentine bacteria for phytoremediation of heavy metals. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 29, p. 120-130, 2009.

RAJKUMAR, M.; AE, N.; NARASIMHA, M.; PRASAD, V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, v. 28, p. 142-149, 2010.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal accumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, v. 180, p. 169-181, 2011.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, v. 278, p. 1-9, 2008.

SANTA CATARINA (Estado). Secretaria de Estado de Coordenação Geral e Planejamento. Subsecretaria de Estudos Geográficos e Estatísticos. Atlas escolar de Santa Catarina. Rio de Janeiro: Aerofoto Cruzeiro/IOESC, 1991. 136 p.

SANTOS, R. dos. Reabilitação de ecossistemas degradados pela mineração de carvão a céu aberto em Santa Catarina, Brasil. 2003. 115f. Tese (Doutorado em Engenharia Mineral) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCH, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, v. 111, p. 743-767, 2013.

SCHULZ B.; BOYLE, C. What are endophytes? In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T. N. (Edit.). *Microbial Root Endophytes*. Berlin: Springer-Verlag, p. 1-13, 2006.

SHENG, X. F.; XIA, J. J.; JIANG, C. Y.; HE, L. Y.; QIAN, M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, v. 156, p. 1164-1170, 2008.

SHIN, M.; SHIM, J.; YOU, Y.; MYUNG, H.; BANG, K.; CHO, M.; KAMALA-KANNAN, S.; OHA, B. Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 199–200, p. 314-320, 2012.

SILVA, M.; FILHO, N. O. H. Roteiro geológico-ambiental ao longo da planície costeira da ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. *Revista Discente Expressões Geográficas*, n. 7, p. 210-231, 2011.

SOUZA, M. L. D. R. Estudo taxonômico do gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Insula*, v. 16, p. 3-109, 1986.

SRINATH, R.; BABU, S. *Bacillus anthracis*-like strain-carrying *Pseudomonas* FPVA gene occurs as endophyte in vegetables. *Journal of Food Safety*, v. 34, p. 57-61, 2014.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. 2nd ed. Wiley: New York, USA, 1999.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, p. 491-502, 2003.

SUN, L.; ZHANG, Y.; HE, L.; CHEN, Z.; WANG, Q.; QIAN, M.; SHENG, X. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 501-509, 2010.

TAGHAVI, S.; BARAC, T.; GREENBERG, B.; BORREMANS, B.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 8500-8505, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TEIXEIRA, M. B.; COURA NETO, A. B.; PASTORE, U.; RANGEL FILHO, A. L. R. As regiões fitoecológicas, sua natureza e seus recursos econômicos – Estudo fitogeográfico. In: *Levantamento de recursos naturais*. v. 33. Porto Alegre: IBGE, 1986.

TREVISAN, R. 2009. *Eleocharis* (Cyperaceae) na Região Sul do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 225p.

USEPA – U.S Protection Agency. Soil screening guidance: technical background document. U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC.

VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology and Ecology*, v. 64, p. 283-96, 2008.

WAN, Y.; LUO, S.; CHEN, J.; XIAO, X.; CHEN, L.; ZENG, G.; LIU, C.; HE, Y. Effect of endophyte infection on growth parameters and Cd-induced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. Chemosphere, v. 89, p. 743–750, 2012.

WEYENS, N., VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; VANGRONVELD, J. Phytoremediation: plant endophyte partnerships take the challenge. Current Opinion in Biotechnology, v. 20, p. 248-254, 2009a.

WEYENS, N., VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONVELD, J. Exploiting plant microbe partnerships for improving biomass production and remediation. Trends in Biotechnology, v. 27, p. 591-598, 2009b.

WEYENS, N.; TRUYENS, S.; SAENEN, E.; BOULET, J.; DUPAE, J.; VAN DER LELIE, D.; CARLEER, R.; VANGRONVELD, J. Endophytes and their potential to deal with co-contamination of organic contaminants (toluene) and toxic metals (nickel) during phytoremediation. International Journal of Phytoremediation, v. 13, p. 244-255, 2011.

WONG, M. H. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. Chemosphere, v. 50, p. 775-780, 2003.

WURDACK, J. J. Melastomataceae of Santa Catarina. Sellowia, v. 14, p. 109-217, 1962.

XINXIAN, L.; XUEMEI, C.; YAGANG, C.; WOON-CHUNG, W. J.; ZEBIN, W.; QITAN, W. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. World Journal Microbiology and Biotechnology, v. 27, p. 1197-1207, 2011.

ZAIDI, S., USMANI, S., SINGH, B. R.; MUSARRAT, J. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. Chemosphere, v. 64, p. 991-997, 2006.

ZHANG, X. H.; LIU, J.; HUANG, H. T.; CHEN, J.; ZHU, Y. N.; WANG, D.Q. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. Chemosphere, v. 67, p. 1138-1143, 2007.

ZHU, I.; GUAN, D.; LUO, J.; RATHINASABAPATHI, B.; MA, L. Q. Characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria from hyperaccumulators *Pteris vittata* and *Pteris multifida*. Chemosphere, v. 113, p. 9–16, 2014.

ANEXOS

Anexo A: Número de endofíticos isolados a partir dos diferentes tecidos vegetais e estações do ano.

Espécie Vegetal	Siderópolis		Florianópolis	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
<i>Eleocharis</i> sp.	4	1	20	4
<i>Miconia ligustroides</i>	12	2	7	0
<i>Ocotea pulchella</i>	14	0	17	12
<i>Tibouchina ramboi</i>	11	10	ND	ND

Espécies Vegetais	Siderópolis			
	Inverno		Primavera	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
Eleocharis	1	0	3	1
Miconia	11	1	1	1
Ocotea	5	0	9	0
Tibouchina	8	7	3	3
Total	25	8	16	5

Espécies Vegetais	Florianópolis			
	Primavera		Outono	
	Raiz	Folha	Raiz	Folha
Eleocharis	11	4	9	0
Miconia	0	0	7	0
Ocotea	6	2	11	10
Total	17	6	27	10

Anexo B: Descrição das espécies identificadas.

Código LAMA	Código Isolamento	Espécie Vegetal	Origem	Cor da Colônia	Local de Coleta	Qtidade Nucleotídeos	Descrição	Max Score	Total Score	Cobertura de Consultas	E value	Similaridade	Acesso
LAMA 1088	E2 R-1	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Amarela	Siderópolis	1286	<i>Bacillus stratosphericus</i> strain 41KF2a	2375	2375	100%	0.0	100%	NR_118441.1
LAMA 1089	M2 Ro 1	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Incolor	Siderópolis	1215	<i>Streptomyces ambofaciens</i> strain NBRC 12836	2163	2163	100%	0.0	99%	NR_041079.1
LAMA 1090	M2 Ro 2 A	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1382	<i>Paenibacillus vulneris</i> strain CCUG 53270	2477	2477	100%	0.0	99%	NR_117618.1
LAMA 1091	M2 Ro 2B1	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1392	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 strain ATCC 14579	2567	2567	100%	0.0	99%	NR_074540.1
LAMA 1092	M2 Ro 2B2	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1438	<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757	2647	2647	100%	0.0	99%	NR_044428.1
LAMA 1093	M2 Ro 3	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Incolor	Siderópolis	679	<i>Streptomyces thinghirensis</i> strain S10	1205	1205	100%	0.0	99%	NR_116901.1

LAMA 1094	M2 Ro 4	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1399	Paenibacillus humicus strain PC-147	2579	2579	100%	0.0	99%	NR_042577.1
LAMA 1095	M2 Ro 5	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Incolor	Siderópolis	1048	Paenibacillus vulneris strain CCUG 53270	1875	1875	99%	0.0	99%	NR_117618.1
LAMA 1096	M4 Ro 1	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Incolor	Siderópolis	1383	Bacillus kochii strain WCC 4582	2534	2534	100%	0.0	99%	NR_117050.1
LAMA 1097	M4 Ro 2	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1422	Bacillus purgationiresistens strain DS22	2407	2407	99%	0.0	97%	NR_108492.1
LAMA 1098	M4 Ro 3	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Amarela	Siderópolis	1182	Bacillus kochii strain WCC 4582	2120	2120	100%	0.0	99%	NR_117050.1
LAMA 1147	M4 R- 1	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1292	Bacillus oceanisediminis strain H2	2364	2364	100%	0.0	99%	NR_117285.1
-----	M2-E- 2	<i>Miconia ligustroides</i>	Folha	Rosa	Siderópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1145	ORo 1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1010	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1858	1858	100%	0.0	99%	NR_074453.1
							Bacillus anthracis strain ATCC 14578	1858	1858	100%	0.0	99%	NR_041248.1
LAMA 1167	ORo2	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1137	Bacillus thuringiensis Bt407	2100	2100	100%	0.0	100%	NR_102506.1
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	2100	2100	100%	0.0	100%	NR_074540.1
							Bacillus toyonensis strain BCT-7112	2100	2100	100%	0.1	200%	NR_121761.1
LAMA 1184	ORo 3	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1291	Brevibacillus borstelensis strain DSM	2385	2385	100%	0.0	100%	NR_040984.1

							6347						
LAMA 1146	OR-1 A	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	546	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	959	959	99%	0.0	99%	NR_074453.1
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	959	959	99%	0.0	99%	NR_074540.1
LAMA 1185	OR-1 B	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	787	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1454	1454	100%	0.0	100%	NR_074453.1
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	1454	1454	100%	0.0	100%	NR_074540.1
—	T1-Ro 1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
LAMA 1099	T1 Ro 2	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1352	Bacillus thuringiensis strain IAM 12077	2497	2497	100%	0.0	100%	NR_043403.1
—	T1-Ro 3	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
—	T1-R-1 A	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
—	T1-R-1 B1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Incolor	Siderópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
—	T1-R-1 B2	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Amarela	Siderópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
LAMA 1100	T1 R-2 A	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1306	Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	2410	2410	99%	0.0	100%	NR_074540.1
LAMA 1148	T1 R-2 B	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1220	Bradyrhizobium lablabi strain CCBAU 23086	2215	2215	100%	0.0	99%	NR_117513.1

LAMA 1149	T1 Fo 1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Rosa	Siderópolis	1296	Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	2394	2394	100%	0.0	100%	NR_074540.1
-----	T1 Fo 2	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Rosa	Siderópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-----	T1 Fo 3	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Branca	Siderópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1181	T1 Fo 4	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Branca	Siderópolis	855	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1574	1574	100%	0.0	99%	NR_074453.1
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	1574	1574	100%	0.0	99%	NR_074540.1
-----	T1 Fo 5	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Branca	Siderópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1101	T1 Fo 6	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Branca	Siderópolis	1325	Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	2447	2447	100%	0.0	100%	NR_074540.1
-----	T1 Fo 8	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Incolor	Siderópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1177	E1 Ro 1	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Incolor	Florianópolis	1286	Herbaspirillum huttiense strain ATCC 14670	2331	2331	100%	0.0	99%	NR_024698.1
-----	E1 Ro 2	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Incolor	Florianópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1103	E1 Ro 3	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1279	Paenibacillus illinoisensis strain NBRC 15959	2350	2350	100%	0.0	99%	NR_113828.1

LAMA 1150	E1 Ro 4	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Creme	Florianópolis	1345	Herbaspirillum aquaticum strain IEH 4430	2447	2447	100%	0.0	99%	NR_116605.1
LAMA 1180	E1 Ro 5	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Creme	Florianópolis	833	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1539	1539	100%	0.0	100%	NR_074453.1
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	1539	1539	100%	0.0	100%	NR_074540.1
LAMA 1104	E3 Ro 1	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1417	Bacillus firmus strain NBRC 15306	2512	2512	100%	0.0	99%	NR_112635.1
LAMA 1162	E3 Ro 2	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1394	Bacillus firmus strain NBRC 15306	2501	2501	100%	0.0	99%	NR_112635.1
LAMA 1105	E1 R-1 A	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	895	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1637	1637	100%	0.0	99%	NR_074453.1
							Bacillus anthracis strain ATCC 14578	1637	1637	100%	0.0	99%	NR_041248.1
LAMA 1106	E1 R-1 B	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Incolor	Florianópolis	1413	Herbaspirillum huttiense strain NBRC 102521	2604	2604	100%	0.0	99%	NR_114139.1
							Herbaspirillum huttiense strain ATCC 14670	2604	2604	100%	0.0	99%	NR_024698.1
LAMA 1107	E1 R-1 C	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Incolor	Florianópolis	1347	Herbaspirillum huttiense strain ATCC 14670	2483	2483	100%	0.0	99%	NR_024698.1
—	E1 Fo ±	<i>Eleocharis</i> sp.	Folha	Incolor	Florianópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
LAMA 1108	E1 Fo 2	<i>Eleocharis</i> sp.	Folha	Amarela	Florianópolis	715	Pantoea ananatis AJ13355 strain AJ13355	1234	1234	100%	0.0	98%	NR_074740.1

LAMA 1109	E1 Fo 3	<i>Eleocharis</i> sp.	Folha	Creme	Florianópolis	1394	Herbaspirillum huttiense strain ATCC 14670	2569	2569	100%	0.0	99%	NR_024698.1
LAMA 1110	E1 F-1	<i>Eleocharis</i> sp.	Folha	Amarela	Florianópolis	539	Pantoea ananatis strain LMG 2665	959	959	100%	0.0	99%	NR_119362.1
LAMA 1111	O2 Ro 1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Florianópolis	1277	Bacillus toyonensis strain BCT-7112	2304	2304	100%	0.0	100%	NR_121761.1
							Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792	2304	2304	100%	0.0	100%	NR_114581.1
LAMA 1178	O2 Ro 2 A	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Creme	Florianópolis	1272	Lysinibacillus xylanilyticus strain XDB9	2322	2322	100%	0.0	99%	NR_116698.1
LAMA 1169	O2 Ro 2B1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Creme	Florianópolis	1157	Lysinibacillus xylanilyticus strain XDB9	2115	2115	100%	0.0	99%	NR_116698.1
LAMA 1112	O2 Ro 2B2	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Amarela	Florianópolis	1159	Bacillus safensis strain FO-36b	2141	2141	100%	0.0	100%	NR_041794.1
LAMA 1113	O2 Ro 3	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Florianópolis	362	Bacillus toyonensis strain BCT-7112	669	669	100%	0.0	100%	NR_121761.1
							Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792	669	669	100%	0.0	100%	NR_114581.1
							Bacillus thuringiensis strain IAM 12077	669	669	100%	0.0	100%	NR_043403.1
LAMA 1168	O2 R-1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Florianópolis	1251	Bacillus thuringiensis Bt407	2300	2300	100%	0.0	99%	NR_102506.1
							Bacillus weihenstephanensis strain DSM 11821	2300	2300	100%	0.0	99%	NR_024697.1

							Bacillus mycoides strain 273	2300	2300	100%	0.0	99%	NR_036880.1
—	O1 F-1 A	Ocotea pulchella	Folha	Branca	Florianópolis	—	—	—	—	—	—	—	—
LAMA 1172	O1 F-1 B1	Ocotea pulchella	Folha	Branca	Florianópolis	1298	Bacillus stratosphericus strain 41KF2a	2398	2398	100%	0.0	100%	NR_042336.1
							Bacillus aerophilus strain 28K	2398	2398	100%	0.0	100%	NR_042339.1
							Bacillus altitudinis strain 41KF2b	2398	2398	100%	0.0	100%	NR_042337.1
LAMA 1114	O1 F-B2	Ocotea pulchella	Folha	Incolor	Florianópolis	1353	Bacillus stratosphericus strain :41KF2a	2499	2499	100%	0.0	100%	NR_042336.1
							Bacillus aerophilus strain 28K	2499	2499	100%	0.0	100%	NR_042339.1
							Bacillus altitudinis strain 41KF2b	2499	2499	100%	0.0	100%	NR_042337.1
LAMA 1165	E3 R-1 A	Eleocharis sp.	Raiz	Branca	Siderópolis	654	Brevibacterium frigoritolerans strain DSM 8801	1197	1197	100%	0.0	99%	NR_117474.1
LAMA 1182	E3 R-1 B	Eleocharis sp.	Raiz	Branca	Siderópolis	984	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1816	1816	99%	0.0	100%	NR_074453.1
							Bacillus anthracis strain ATCC 14578	1816	1816	99%	0.0	100%	NR_041248.1
LAMA 1176	E1 Fo	Eleocharis sp.	Folha	Branca	Siderópolis	1250	Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	2303	2303	100%	0.0	99%	NR_074540.1
LAMA	M1 R-	Miconia	Raiz	Branca	Siderópolis	855	Bacillus anthracis str.	1580	1580	100%	0.0	100%	NR_074453.1

1164	1	<i>ligustroides</i>					Ames strain Ames						
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	1580	1580	100%	0.0	100%	NR_074540.1
							Bacillus anthracis strain ATCC 14578	1580	1580	100%	0.0	100%	NR_041248.1
LAMA 1170	M3 F-1	<i>Miconia ligustroides</i>	Folha	Vermelha	Siderópolis	1224	Serratia marcescens subsp. marcescens NBRC 102204	2255	2255	100%	0.0	99%	NR_114043.1
LAMA 1142	O1 Ro 1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1289	Burkholderia tropica strain Ppe8	2333	2333	99%	0.0	99%	NR_028965.1
LAMA 1166	O1 Ro 2	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	947	Mesorhizobium loti MAFF303099 strain MAFF303099	1748	1748	99%	0.0	100%	NR_074162.1
LAMA 1117	O1 Ro 3	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Rosa	Siderópolis	591	Methylobacterium komagatae strain 002-079	1092	1092	100%	0.0	100%	NR_041441.1
LAMA 1161	O1 Ro 5	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Bege	Siderópolis	1319	Terriglobus roseus strain KBS 63	2266	2266	100%	0.0	98%	NR_043918.1
LAMA 1160	O1 Ro 6	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1063	Mesorhizobium huakuii strain NBRC 15243	1953	1953	100%	0.0	99%	NR_113738.1
LAMA 1151	O1 R-1 A	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1363	Burkholderia tropica strain Ppe8	2466	2466	98%	0.0	99%	NR_028965.1
LAMA 1152	O1 R-1 B	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1197	Mesorhizobium loti MAFF303099 strain MAFF303099	2211	2211	100%	0.0	100%	NR_074162.1
LAMA 1118	f O1 R1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1286	Paracoccus marinus strain NBRC 100637	2320	2320	100%	0.0	99%	NR_113921.1

LAMA 1119	f O1 R2	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Siderópolis	1154	Micrococcus yunnanensis strain YIM 65004	2006	2006	98%	0.0	98%	NR_116578.1
LAMA 1174	T2 Fo	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Branca	Siderópolis	1112	Bacillus stratosphericus strain 41KF2a	2050	2050	100%	0.0	99%	NR_042336.1
							Bacillus aerophilus strain 28K	2050	2050	100%	0.0	99%	NR_042339.1
							Bacillus altitudinis strain 41KF2b	2050	2050	100%	0.0	99%	NR_042337.1
LAMA 1173	T3 Fo 1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Bege	Siderópolis	1221	Paenibacillus glucanolyticus strain NBRC 15330	2252	2252	100%	0.0	99%	NR_113748.1
LAMA 1159	T3 Fo 2	<i>Tibouchina ramboi</i>	Folha	Rosa	Siderópolis	1279	Methylobacterium phyllosphaerae strain CBMB27	2313	2313	100%	0.0	99%	NR_044105.1
LAMA 1179	T3 R-1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Amarela	Siderópolis	985	Brevibacillus borstelensis strain DSM 6347	1814	1814	100%	0.0	99%	NR_040984.1
LAMA 1120	f T2 R1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Amarela	Siderópolis	1356	Paenibacillus puldeungensis strain CAU 9324	2217	2217	100%	0.0	96%	NR_117451.1
LAMA 1153	f T3 R1	<i>Tibouchina ramboi</i>	Raíz	Incolor	Siderópolis	1261	Bacillus safensis strain FO-36b	2329	2329	100%	0.0	100%	NR_041794.1
LAMA 1141	E3 R-1 B2	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Siderópolis	1314	Brevibacterium frigoritolerans strain DSM 8801	2422	2422	100%	0.0	99%	NR_042639.1
LAMA	E1 Ro	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1247	Brevibacillus brevis	2278	2278	100%	0.0	99%	NR_041524.1

1121							strain NBRC 15304						
LAMA 1122	E2 Ro1	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1403	Bacillus cereus ATCC 14579 strain ATCC 14579	2553	2553	100%	0.0	99%	NR_074540.1
LAMA 1123	E2 Ro2	<i>Eleocharis elongata</i>	Raíz	Incolor	Florianópolis	1294	Paenibacillus pabuli strain HSCC 492	2390	2390	100%	0.0	100%	NR_040853.1
LAMA 1124	E2 Ro3	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Incolor	Florianópolis	1381	Paenibacillus aestuarii strain CJ25	2250	2250	99%	0.0	96%	NR_116365.1
LAMA 1125	E2 Ro4	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1380	Paenibacillus aestuarii strain CJ25	2265	2265	99%	0.0	96%	NR_116365.1
LAMA 1126	E3 Ro1	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	473	Bacillus thuringiensis Bt407	874	874	100%	0.0	100%	NR_102506.1
LAMA 1127	E3 Ro2	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	1285	Bacillus toyonensis strain BCT-7112	2362	2362	100%	0.0	99%	NR_121761.1
							Bacillus thuringiensis strain IAM 12077	2362	2362	100%	0.0	99%	NR_043403.1
LAMA 1128	f E3 R2 A	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Incolor	Florianópolis	1169	Herbaspirillum aquaticum strain IEH 4430	2126	2126	100%	0.0	99%	NR_116605.1
LAMA 1154	f E3 R2 B	<i>Eleocharis</i> sp.	Raíz	Branca	Florianópolis	801	Silvimonas iriomotensis strain NBRC 103188	1371	1371	100%	0.0	98%	NR_112687.1
LAMA 1129	M2 Ro 1	<i>Miconia ligustroides</i>	Raíz	Branca	Florianópolis	1001	Paenibacillus taichungensis strain BCRC 17757	1831	1831	100%	0.0	99%	NR_044428.1
							Paenibacillus pabuli strain HSCC 492T (NRRL NRS-924T)	1831	1831	100%	0.0	99%	NR_040853.1

LAMA 1171	O3 Fo 1	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Amarela	Florianópolis	1012	Curtobacterium oceanosedimentum strain ATCC 31317	1869	1869	100%	0.0	100%	NR_104839.1
-----	O3 Fo 2	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Rosa	Florianópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1158	O3 Fo 3	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Rosa	Florianópolis	1268	Methylobacterium longum strain 440	2309	2309	100%	0.0	99%	NR_117045.1
-----	O3 Fo 4	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Rosa	Florianópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1183	O3 Fo 5	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Preta	Florianópolis	928	Bacillus anthracis str. Ames strain Ames	1703	1703	100%	0.0	99%	NR_074453.1
							Bacillus cereus strain ATCC 14579 rrnA operon	1703	1703	100%	0.0	99%	NR_074540.1
-----	O3 Fo 6	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Incolor	Florianópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1138	O3 Fo 7	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Rosa	Florianópolis	1242	Methylobacterium komagatae strain 002-079	2206	2206	100%	0.0	99%	NR_041441.1
LAMA 1139	O1 R-1 A	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Incolor	Florianópolis	809	Pseudomonas cremoricolorata strain NBRC 16634	1441	1441	99%	0.0	99%	NR_113855.1
							Pseudomonas parafulva strain AJ 2129	1441	1441	99%	0.0	99%	NR_040859.1
LAMA 1143	O1 R-1 B	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Creme	Florianópolis	984	Pseudomonas cremoricolorata strain NBRC 16634	1762	1762	100%	0.0	99%	NR_113855.1

							Pseudomonas parafulva strain AJ 2129	1762	1762	100%	0.0	99%	NR_040859.1
LAMA 1140	O1 F-1	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Branca	Florianópolis	1302	Bacillus stratosphericus strain 41KF2a	2403	2403	99%	0.0	100%	NR_042336.1
							Bacillus aerophilus strain 28K	2403	2403	99%	0.0	100%	NR_042339.1
							Bacillus altitudinis strain 41KF2b	2403	2403	99%	0.0	100%	NR_042337.1
LAMA 1157	O2 R- 1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Branca	Florianópolis	1228	Rhizobium multihospitium strain CCBAU 83401	2268	2268	100%	0.0	100%	NR_044053.1
-----	O3 R- 1	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Incolor	Florianópolis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LAMA 1175	O3 F-1 A	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Branca	Florianópolis	1267	Bacillus stratosphericus strain 41KF2a	2340	2340	100%	0.0	100%	NR_042336.1
							Bacillus aerophilus strain 28K	2340	2340	100%	0.0	100%	NR_042339.1
							Bacillus altitudinis strain 41KF2b	2340	2340	100%	0.0	100%	NR_042337.1
LAMA 1163	O3 F-1 B	<i>Ocotea pulchella</i>	Folha	Rosa	Florianópolis	1260	Methylobacterium longum strain 440	2294	2294	100%	0.0	99%	NR_117045.1
LAMA 1102	f O3 R1 A	<i>Ocotea pulchella</i>	Raíz	Bege	Florianópolis		ND						

----- = Bactérias perdida

